

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS FISIOLÓGICAS DE ALGUMAS PROTEÍNAS ALIMENTÍCIAS

Helaine Beatriz Jacobucci

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

Campinas, S.P.

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

J159p Jacobucci, Helaine Beatriz.
 Propriedades Nutritivas e Funcionais Fisiológicas de Algumas
 Proteínas Alimentícias / Helaine Beatriz Jacobucci. -- Campinas, SP:
 [s.n], 2010.

 Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Engenharia de Alimentos.

 1. Proteínas alimentícias. 2. Valor nutritivo. 3.
 Imunomodulação. 4. Glutathione. 5. Modelo experimental. I.
 Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Nutritional and physiological functional properties of some food proteins.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Food - Protein, Nutritive value, Immunomodulation,

Glutathione, Experimental model

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Vera Lúcia Signoreli Baldini

Nádia Fátima Gibrim

Margareth Lopes Galvão Saron

Janesca Alban Roman

Data da defesa: 17/12/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de tese defendida em 17/12/2010 por Helaine Beatriz Jacobucci aprovado pela comissão julgadora em 17/12/2010.

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri (Orientador)
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Vera Lúcia Signoreli Baldini
ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos

Profa. Dra. Nádia Fátima Gibrim Pereira Dias
UNIP - Universidade Paulista

Dra. Margareth Lopes Galvão Saron
Centro Universitário de Volta Redonda

Profa. Dra. Janesca Alban Roman
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Mário Roberto Marostica Junior
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Vera Sonia Nunes da Silva
ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dra. Fabiane La Flor Ziegler

Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo. E você pode evitar que ela vá à falência. Há muitas pessoas que precisam, admiram e torcem por você. Gostaria que você sempre se lembrasse de que ser feliz não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem desilusões. Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza. Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos. Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato

Augusto Cury

Não existe erros, apenas lições. O crescimento é um processo de tentativa e erro: experimentação. As experiências que não deram certo fazem parte do processo, assim como as bem-sucedidas. As respostas estão dentro de você. Tudo o que tem a fazer é analisar, ouvir e acreditar.

Se você abre uma porta, você pode ou não entrar em uma nova sala. Você pode não entrar e ficar observando a vida. Mas se você vence a dúvida, o temor, e entra, dá um grande passo: nessa sala vive-se! Mas, também, tem um preço... São inúmeras outras portas que você descobre. Às vezes curte-se mil e uma.

O grande segredo é saber quando e qual porta deve ser aberta.

A vida não é rigorosa, ela proporciona erros e acertos.

Os erros podem ser transformados em acertos quando com eles se aprende. Não existe a segurança do acerto eterno. A vida é generosa, a cada sala que se vive, descobre-se tantas outras portas. E a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas.

Ela privilegia quem descobre seus segredos e generosamente oferece ofortunadas portas. Mas a vida também pode ser dura e severa. Se você não ultrapassar a porta, terá sempre a mesma porta pela frente.

É a repetição perante a criação, é a monotonia monocromática perante a multiplicidade das cores, é a estagnação da vida...

Para a vida, as portas não são obstáculos, mas diferentes passagens!

Içami Tiba

Ao Prof. Sgarbieri,

Durante todos esses anos várias pessoas colaboraram e nos ensinaram muitas coisas... E confesso que não aprendemos tudo que quisemos, mas aprendemos tudo que pudemos. Andamos muito tentando alcançar este momento. E agora quero revelar meus sinceros agradecimentos à pessoa que me fez sorrir, chorar, sentir, viver... crescer...

Obrigada!!!

Aos meus queridos e eternos pais Atílio e Cidinha,

Alguém especial

Tenho guardado na memória e no coração:

Cada olhar brilhante que trocamos,

Cada sorriso feliz que sorrimos...

Cada aperto de mão que nós demos ...

Cada mensagem enviada,

Cada palavra dita...

Cada lágrima de alegria chorada,

E cada música ouvida,

E cada conversa que tivemos,

Dentro da amizade, cumplicidade

e afinidade tão grandes...

Seria uma emoção de invadir o coração...

Saber que vocês guardam sempre em sua memória:

Que eu os amei, amo e sempre amarei...

Pois não há distância que afaste um grande amor...

Nem tempo que faça esquecê-los...

Nem barreiras que não sejam vencidas por Deus...

Mesmo que hoje você não consigam ver que são especiais...

Vocês são muito especiais para mim!!

“Amo Vocês”

Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho ...
Porque cada pessoa é única pra nós, e nenhuma substitui a outra...
Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
mas não vai só...
Cada um que passa em nossa vida, leva um pouco de nós mesmos,
e nos deixa um pouco de si mesmo...
Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada...
Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada...
Esta é a mais bela realidade da vida.
A prova tremenda da importância de cada um, é que ninguém se aproxima do
outro por acaso...
Antoine de Saint-Exupéry

À Verinha, pelo carinho e prontidão com que sempre me auxiliou, amiga de todas as horas e exemplo de profissional, por estar sempre presente em todas as etapas desse trabalho.

À Nádia, amiga sincera e companheira de lutas e PFCs, por jamais me deixar desanimar, fazendo-me acreditar que seria possível vencer mais essa etapa.

À Cristina Tanikawa, sempre presente aos inúmeros ensaios biológicos e incontáveis PFCs, pela amizade e preciosa ajuda.

Meus mais sinceros agradecimentos!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios; pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação segura e dedicada, exemplo de conduta pessoal e científica. Professor conseguimos chegar ao final!!!!

Ao Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – QUÍMICA e ao Centro de Hortifrutículas, FRUTOTEC e Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios, TECNOLAT do ITAL onde foram desenvolvidos os experimentos desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro por meio do projeto temático, coordenado pelo Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão de dois anos de bolsa, e que permitiu que este trabalho fosse realizado.

Aos membros da Banca Examinadora que contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

Aos pesquisadores Vera Lúcia Signoreli Baldini, Ana Maria Rauen, Ercília, Dilza, Eliana, Flávio, Marcelo e Paulo pela amizade e apoio.

Aos amigos Margareth e Clodoaldo pela amizade, apoio e ajuda incondicionais durante todos esses anos.

Aos Srs. Cosme, Marcelo e hoje também ao Marcos da Secretaria de Pós-Graduação – FEA, pela amizade e pronto atendimento todas as vezes que necessitei.

Ao amigo Luiz Renato, pela eterna boa vontade, sempre prestativo e grande auxílio no biotério.

À Patrícia, Heloísa, Izabela, Tereza, Carol, Elke, Flávia, Janesca, Denise, Saula, Márjorie, Leonídia e Leonice, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do DEPAN, em especial ao Chico, Suzana, Eliete, Fátima, Karla, Soely, Cidinha e Yara, pela grande ajuda durante todos esses anos.

A todos os professores do Depan, que sempre foram prestativos quando precisei.

A professora Dra. Helena Maria André Bolini, atual Coordenadora da Sub-Comissão de Pós-Graduação que me apoiou e acreditou que este trabalho chegasse ao final.

À Sandra, Luzimara e Tatiane pela ajuda, apoio e amizade e grande paciência e também pelas boas risadas que demos tornando um ambiente de trabalho mais agradável.

À Beth Lima, Beth Gomes, Kátia, Renatinho, José Rubens, Aparecido, Kinu, Sr. João e Carlos, pela colaboração na execução dos experimentos.

Aos amigos da Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia da UNICAMP, em especial à Dirce e ao Prof. Paulo, pela amizade e grande ajuda.

Ao pessoal do CPQBA, João Ernesto, Ana, Sirlene e Karin, pela colaboração e ajuda sempre que precisei.

A Gabriela, Isabela e Rafaela, por fazerem parte sem dúvida nenhuma dessa jornada, me suportando todos esses anos, e que não foram muito fáceis, não podendo esquecer do melhor e fiel amigo do homem, Betoven e Lara, sempre aos meus pés nas noites em claro. Agradeço pela atenção, carinho e principalmente paciência de todas vocês.

Em especial a toda minha família, irmãos e irmã, tios e tias, Mara, Fernando e Vera, e é claro, a razão do meu viver, meus eternos pais Atílio e Cidinha.

A minha querida mãe (*in memoriam*) e pai, pelo amor e carinho que sempre demonstraram, pela atenção e disposição em proporcionar o melhor durante todos os momentos. Sinto saudades da sua alegria, da sua companhia, do seu caráter e bondade inconfundíveis. Mãe, esse dia é todo especial e voltado a que você tanto sonhou! Mãe, Pai, amo muito vocês!

A todos que contribuíram para que este trabalho se efetivasse.

A Deus, que, por meio da fé, me dá forças para lutar, ilumina meu caminho, mostra-me o verdadeiro sentido da vida e me faz acreditar que nada é impossível quando a causa é justa e a vontade verdadeira. Presença constante em minha vida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xx
RESUMO GERAL.....	xxvi
GENERAL SUMMARY.....	xxix
CONCLUSÕES GERAIS.....	xxxí
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	xxxii
CAPÍTULO 1: PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS FISIOLÓGICAS DE ALGUMAS PROTEÍNAS ALIMENTÍCIAS: REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 Proteínas do leite	4
1.2.1 Caseínas	5
Propriedades funcionais fisiológicas	7
Peptídios bioativos.....	10
1.2.2 Proteínas do soro de leite	11
Concentrados e isolados protéicos de soro de leite	15
Propriedades funcionais fisiológicas	19
Imunomodulação	21
Efeito hipocolesterolêmico	23
Doenças crônico-degenerativas e longevidade.....	25
Atividade anticâncer	26
Atividade antiulcerogênica	29
1.3 Soja	31

Proteínas da soja	33
Propriedades funcionais fisiológicas	36
Efeito hipocolesterolemizante	36
Atividade anticâncer	37
Efeito nos sintomas da menopausa	39
1.4 Proteínas do sangue bovino	41
1.5 Formação e funcionamento do sistema imunológico	42
1.6 REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 2: PROPRIEDADES IMUNOESTIMULATÓRIAS DE ALGUMAS PROTEÍNAS DE USO TRADICIONAL EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL E HUMANA	80
RESUMO	80
2.1 INTRODUÇÃO	81
2.2 OBJETIVOS	83
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	84
2.3.1 Fontes protéicas utilizadas	84
2.3.2 Métodos de preparação	84
2.3.3 Caracterização dos materiais utilizados.....	88
Composição centesimal	88
2.3.4 Poder imunoestimulante de diferentes proteínas da dieta	88
2.3.5 Monitoramento do efeito imunomodulador	89
Ensaio imunológico do efeito imunomodulador	89
2.3.6 Ensaio biológico	89
Dietas experimentais	89
Animais de experimentação	90
2.3.7 Análises estatísticas	99
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99

2.4.1 Composição química das fontes protéicas	99
2.4.2 Efeito imunomodulador	101
2.5 CONCLUSÃO	115
2.6 REFERÊNCIAS	116
CAPÍTULO 3: DIGESTÃO, ABSORÇÃO E ESTÍMULO À SÍNTESE TECIDUAL DE GLUTATIONA DE UM CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE E DA CASEÍNA, NA FORMA ÍNTEGRA E HIDROLISADA	122
RESUMO	122
3.1 INTRODUÇÃO	123
3.2 OBJETIVOS	128
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	128
3.3.1 Obtenção de matéria-prima	128
3.3.2 Hidrólise enzimática e determinação do grau de hidrólise (GH%) ...	128
3.3.3 Caracterização dos hidrolisados	129
Composição centesimal	128
Determinação de aminoácidos	129
3.3.4 Ensaio biológico com ratos	131
Animais	132
Composição das dietas experimentais	132
Dosagem de glutathione	133
3.3.5 Análise estatística	133
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	133
3.4.1 Composição centesimal dos materiais protéicos	133
3.4.2 Ganho de peso	140
3.5 CONCLUSÃO	148
3.6 REFERÊNCIAS	148
CAPÍTULO 4: PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS DE UM PRODUTO PARA A NUTRIÇÃO INFANTIL A BASE DE PROTEÍNAS DE LEITE BOVINO – COMPARAÇÃO COM PRODUTO COMERCIAL	

SIMILAR DE USO CONSAGRADO	158
RESUMO	158
4.1 INTRODUÇÃO	159
4.2 OBJETIVOS	160
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	161
4.3.1. Obtenção de matéria-prima	161
4.3.2 Caracterização dos concentrados protéicos desidratados	161
Composição centesimal	161
Determinação de aminoácidos	162
Escore de Aminoácidos Essenciais (EAE)	162
4.3.3 Ensaios biológicos	163
Ensaio com camundongos	163
Ensaio biológico com ratos	163
Dietas experimentais	165
4.3.4 Monitoramento do efeito imunomodulador	168
Imunização para teste imunológico	168
Ensaio imunológico para contagem de células formadoras de placas (CFP)	168
Dosagem de glutathiona	168
4.3.5 Índices nutricionais	169
4.3.6 Análises estatísticas	169
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	169
4.4.1 Escore de Aminoácidos Essenciais (EAE)	169
4.4.2 Ensaios imunológicos e glutathiona total hepática	172
4.4.3 Avaliação nutricional	177
4.5 CONCLUSÃO	182
4.6 REFERÊNCIAS	183

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Pág.
Tabela 1 - Composição centesimal aproximada (média \pm desvio padrão) em base seca, dos concentrados protéicos de leite bovino.....	99
Tabela 2 - Composição centesimal aproximada (média \pm desvio padrão), em base seca, das seguintes dietas: caseína micelar comercial, isolado protéico de soro, albumina sérica bovina, globulina bovina.....	100
 CAPÍTULO 3	
Tabela 1 - Composição centesimal aproximada (média \pm desvio padrão) de concentrados e hidrolisados protéicos.....	134
Tabela 2 - Perfil de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) em base seca, e escore de aminoácidos essenciais (EAE) de concentrado protéico de soro de leite bovino, caseína comercial e hidrolisados, comparados com a referência da FAO/WHO.....	136
Tabela 3 - Aminoácidos essenciais e condicionalmente essenciais com propriedades funcionais fisiológicas	140
Tabela 4 - Ganho de peso e consumo de dieta (média \pm desvio padrão), obtidos com ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas contendo 12% de proteína, por 4 semanas.....	142

Tabela 5-	Proteína total (g/dL), albumina (g/dL) e relação albumina/globulina (média \pm desvio padrão),determinados no soro sangüíneo de ratos machos recém desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas contendo 12% de proteína após 14 dias de ensaio.....	143
Tabela 6 -	Proteína total (g/dL), albumina (g/dL) e relação albumina/globulina (média \pm desvio padrão),determinados no soro sangüíneo de ratos machos recém desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas contendo 12% de proteína após 25 dias de ensaio.....	144
Tabela 7 -	Concentração de glutathione (média \pm desvio padrão),medidas em fígados de ratos machos Wistar, alimentados durante 14 e 25 dias com dietas contendo 12% de diferentes proteínas.....	147

CAPÍTULO 4

Tabela 1 -	Composição das dietas utilizadas para ensaio com camundongos da linhagem A/Uni.....	166
Tabela 2 -	Composição das misturas de vitaminas e minerais (MCassab, SP) utilizadas para ensaio com camundongos da linhagem A/Uni.....	167
Tabela 3 -	Perfil de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) e escore químico (EAE) de concentrado protéico obtidos de leite bovino, caseína micelar, caseína comercial e FC, produto comercial, comparados com a referência da FAO/WHO.....	171
Tabela 4 -	Concentrações de glutathione (média \pm desvio padrão) medidas em fígados de camundongos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 10% de proteína.....	173
Tabela 5 -	Resposta imune humoral (média \pm desvio padrão) verificada	

	com camundongos isogênicos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína.....	176
Tabela 6 -	Ganho de peso, consumo de dieta (g) e quociente de eficiência alimentar (QEA) em ratos machos Wistar, em crescimento, submetidos a diferentes dietas (média \pm desvio padrão).....	178
Tabela 7 -	Digestibilidade aparente (Dap), valor biológico (VBap), utilização líquida verdadeira (NPU) e balanço de nitrogênio (BN) em ratos machos Wistar da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína (média \pm desvio padrão).....	179
Tabela 8 -	Resultados do quociente de eficiência protéica (PER) obtidos com ratos machos da linhagem Wistar (média \pm desvio padrão), alimentados com diferentes dietas (fontes protéicas).....	180

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2	Pág.
Figura 1 - Processo de obtenção das micelas de caseína (CM) por microfiltração seguido de diafiltração a partir do leite bovino fluído (ROMAN, 2002).....	85
Figura 2 - Processo de obtenção do coágulo de caseína desidratado – CoC e concentrado protéico de soro doce – CSD (ZINSLY et al., 2001).....	86
Figura 3 - Processo de obtenção das frações globulina sérica bovina (BSG) e albumina sérica bovina (BSA) (PRATA, 2002).....	87
Figura 4 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem Wistar A/Uni alimentados com dietas contendo 20% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CC (caseína comercial) e CM (caseína micelar).....	91
Figura 5 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 17% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); misturas com 10% de CSD e 7% de uma das proteínas: BSA (albumina de soro bovino), BSG (globulina sérica bovina), IPS (isolado protéico de soja) e CC (caseína comercial); CSD/Lf (17:1), concentrado protéico de soro doce/lactoferrina (17%/1%).....	92
Figura 6 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com	

	dietas contendo 20% de proteínas. CM (caseína micelar); CSD (concentrado protéico de soro doce), nas proporções indicadas..	93
Figura 7 -	Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas formuladas com o CSD (única fonte de proteína) nas seguintes concentrações: 7,5, 10, 15, 17 e 20%.....	94
Figura 8 -	Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com misturas de fontes protéicas contendo 15% de proteínas, a saber: BSA (albumina sérica bovina - 15%); CC/CSD (caseína comercial/ concentrado protéico de soro doce - 3:12); BSA/CSD (7,5:7,5) e BSA/CSD (10:5).....	95
Figura 9 -	Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína das seguintes fontes: NZ (concentrado protéico de soro New Zeland 10%); NZ + HC (5% NZ + 5% hidrolisado de colágeno); CSD (concentrado protéico de soro doce 10%); Ren (isolado protéico de soro produzido em Rennes, França - 10%).....	96
Figura 10 -	Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína das seguintes fontes: CSD-L (concentrado protéico de soro liofilizado); CSD-S (CSD seco em “spray dryer”); CC (caseína comercial) e IPS (isolado protéico de soja).....	97
Figura 11 -	Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos isogênicos da linhagem A/Uni, recebendo dietas com 20% de proteínas. Tratamentos: CSD-L (concentrado protéico de soro	

doce liofilizado), CSD-L3 e CSD-L5 (concentrados protéicos liofilizados e irradiados com doses com 3 e 5kGy, respectivamente).....	98
Figura 12 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CC (caseína comercial) e CM (caseína micelar).....	102
Figura 13 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 17% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); misturas com 10% de CSD e 7% das proteínas BSA (albumina de soro bovino), BSG (globulina sérica bovina), IPS (isolado protéico de soja) e CC (caseína comercial); CSD/Lf (17:1), concentrado protéico de soro doce/lactoferrina (17%/1%).....	104
Figura 14 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteínas, a saber: CM (caseína micelar); CM/CSD (50:50); CM/CSD (20:80) e CM/CSD (80:20)..	106
Figura 15 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas formuladas com o concentrado protéico de soro doce (CSD), utilizado em concentrações protéicas diferentes (7,5, 10, 15, 17 e 20%), da dieta.....	109
Figura 16 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas formuladas com misturas de fontes protéicas contendo	

15% de proteínas, a saber: BSA, albumina sérica bovina; CSD, concentrado protéico de soro doce; CC, caseína comercial	110
Figura 17 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 10% de proteínas, a seguir: Ren (isolado protéico de soro doce produzido em Rennes, 10%); CSD (concentrado protéico de soro doce 10%); NZ (concentrado protéico de soro New Zealand 10%) e NZ+HC (NZ 5% + hidrolisado de colágeno 5%).....	112
Figura 18 - Resposta imune humoral primária observada em camundongos da linhagem A/Uni alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: CSD-L (concentrado protéico de soro de leite liofilizado); CSD-S (CSD seco em “spray dryer”); CC (caseína comercial) e IPS (isolado protéico de soja). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). CFP (células formadoras de placas/baço)	113
Figura 19 - Resposta imune humoral primária observada em camundongos da linhagem A/Uni alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: CSD-L (concentrado protéico de soro doce liofilizado); CSD-L3 (irradiado com 3kGy) e CSD-L5 (irradiado com 5kGy). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).	114

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Protocolo experimental do ensaio biológico efetuado com ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados durante 25 dias com dietas contendo 12% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína	
--	--

	comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH) e Hyprol (caseína hidrolisada comercial com 20% GH)	131
Figura 2 -	Evolução de peso (g) verificada com ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas com 12% de proteína, correspondendo aos tratamentos: CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH); Hyprol (caseína hidrolisada comercial - 20% GH). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	141
CAPÍTULO 4		
Figura 1 -	Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni alimentados com dietas contendo 12% de proteínas, a saber: FC (produto comercial); CSD (concentrado protéico de soro doce); CM (caseína micelar); CSD/CM (50:50 p/p)	164
Figura 2 -	Protocolo experimental para ensaio de avaliação nutricional efetuado com ratos Wistar recém-desmamados alimentados durante 28 dias com dietas contendo 12% de proteínas, a saber: FC (produto comercial); CSD (concentrado protéico de soro doce); CM (caseína micelar); CSD/CM (50:50 p/p).....	165
Figura 3 -	Resposta imune humoral verificada com camundongos isogênicos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína, a saber: FC (produto comercial); CM (caseína micelar); CSD (concentrado protéico de soro doce) e CSD/CM (50:50 p/p). CFP (células formadoras de placas). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).....	175

Figura 4 -	Correlação linear entre os resultados de CFP (células formadoras de placas) e glutathiona, obtida com camundongos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína.....	177
------------	---	-----

RESUMO GERAL

Com o propósito de melhor harmonizar os vários aspectos pesquisados, a tese está apresentada em quatro capítulos. No primeiro capítulo se fez um apanhado geral dos aspectos químicos, nutricionais e funcionais (tanto tecnológicos como os fisiológicos) das fontes protéicas estudadas no decorrer do trabalho e descritos na literatura. No segundo capítulo estudou-se o poder imunoestimulante de uma caseína comercial (CC), da caseína isolada na forma de micelas íntegras (CM), de um isolado de proteína de soja comercial (IPS), um concentrado de globulinas (BSG) e um concentrado de albumina (BSA), isolados do soro de sangue bovino, um isolado protéico de soro de leite bovino (NZ), importado da Nova Zelândia, um isolado de soro de leite bovino produzido em planta piloto, em Rennes (Ren), França, e um concentrado de proteínas de soro de leite bovino (CSD), produzido em planta piloto (Tecnolat), ITAL, Campinas. A imunoestimulação foi medida no baço pelo processo de contagem de células formadoras de placa (CFP) após imunização de camundongos da linhagem A/Uni, com 5×10^6 hemáceas de carneiro. A formação de placas (reação antígeno-anticorpo) foi medida por contagem de células formadoras de placa com auxílio de um microscópio de fase e de uma lupa. O número de CFP, que representa a intensidade da reação antígeno-anticorpo foi expresso para o órgão todo (CFP/baço $\times 10^{-3}$). Foram estudados neste capítulo o poder imunoestimulante sobre as células de baço das várias proteínas, as influências da concentração da proteína na dieta, a combinação do CSD com as outras preparações protéicas e a influência de diferentes tratamentos (processamentos) sobre a imunoestimulação. Concluiu-se que o concentrado de soro de leite bovino produzido no ITAL, Campinas, foi o que apresentou maior poder imunoestimulante e que a imunoestimulação, para esse preparado, manteve-se na faixa de concentração de 7,5 a 20g de proteína/100g de dieta. Todas as fontes de proteína estudadas quando associadas (misturadas) ao CSD na dieta, influíram negativamente no poder imunoestimulante do CSD, exceto a BSA. Tratamentos térmicos acima de 50°C, exceto a pasteurização

(72°C, 15 seg.) e a irradiação acima de 3KG influíram negativamente sobre o poder imunoestimulatório do CSD. A desidratação do concentrado em “Spray dryer” não afetou significativamente o poder de imunoestimulação do CSD. No terceiro capítulo procurou-se estudar as influências da composição em aminoácidos dos materiais protéicos, CSD, caseína, hidrolisado enzimático da caseína e, conseqüentemente, do estado de estruturação dessas proteínas, no consumo de dieta, ganho de peso corporal, proteínas sanguíneas e estímulo à síntese de glutathione, no fígado. No quarto capítulo realizou-se uma avaliação nutricional e imunológica de quatro dietas de composição básica semelhante, variando-se apenas o componente protéico. As dietas estudadas foram, uma fórmula comercial tomada como referência (FC), uma dieta à base de caseína micelar (CM), outra à base de CSD e finalmente uma mistura 50:50 CSD/CM. Para a avaliação do estímulo imunológico utilizaram-se camundongos da linhagem A/Uni com 6-8 semanas de idade e a técnica de imunoestimulação com injeção de hemáceas de carneiro (5×10^6 células), seguido da determinação do número de células formadoras de placa (CFP), contadas em suspensão de células de baço de animais, cinco dias após imunização. As CFP representam reações antígeno-anticorpo, anticorpos que representam a imunoglobulina M (IgM), reação imune primária em resposta ao imunógeno das hemáceas de carneiro. Os resultados da imunoestimulação foram mais baixos para a dieta CM, mais elevados para as dietas CSD e FC e intermediários para CM/CSD (50:50). Estatisticamente não houve diferença entre as dietas CSD e FC nem entre CSD/CM e FC ($p > 0,05$), porém houve diferença estatística em favor da dieta CSD em relação à CM e CSD/CM ($p < 0,05$). Em relação ao poder de estímulo à glutathione, a dieta CSD revelou maior concentração hepática ($8,02 \pm 0,59$ μ moles/g de tecido). Não houve diferença estatística para glutathione entre FC e CSD/CM ($6,55 \pm 0,96$ μ moles/g de tecido) de glutathione hepática. Demonstrou-se uma correlação altamente positiva ($CPF = 3,3395 + 9,0913 \times GSH$, $r = 0,94$) entre os estímulos à síntese de IgM (baço) e de GSH (fígado). Os parâmetros nutricionais consumo de dieta, ganho de peso, quociente de eficiência alimentar (QEA), digestibilidade aparente da proteína (Dap%), valor biológico aparente (VBap%), balanço de nitrogênio (BN) e quociente

de eficiência protéica (PER), foram todos bastante elevados e não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$). Tomados no todo, os resultados confirmam que, elevados valores nutricionais podem não representar elevadas propriedades funcionais-fisiológicas, avaliados nesta pesquisa como poder imunomodulador e estímulo à síntese de glutathione.

GENERAL SUMMARY

With the purpose of better harmonize the various aspects studied in this thesis, it was organized in four chapters. The first chapter consisted of an overview of the chemical nutritional and functional (technologic and physiologic) properties of the protein sources studied in this thesis, utilizing data from recent literature. The main objective of the second chapter was to comparatively demonstrate the immunestimulating power of various protein systems of food origin, including: a commercial casein preparation (CC), a casein isolated in pilot plant in the form of whole micelles (CM), a commercial soy protein isolate (SPI), a bovine serum albumin (BSA) and a bovine serum globulin (BSG) isolated in laboratory from bovine serum, a bovine whey protein isolate (NZ) imported from New Zealand, a bovine whey protein isolate produced in Pilot plant in Rennes (Ren), Rennes France, a bovine whey protein concentrate (WPC) produced in Pilot Plant, ITAL, Campinas. The immunestimulation was measured in spleen cells by counting Plaque Forming Cells (PFC) using A/Uni mice after immunization with sheep red blood cells (SRBC = 5×10^6 cells). The Plaque (antigen-antibody reaction) was quantified in spleen cell suspensions by using a phase microscope and a lup. The number of plaque forming cells (PFC) was considered for the whole spleen and expressed as (PFC/spleen $\times 10^{-3}$). The immunestimulating power on the spleen cells was studied for various protein sources. The influence of dietary protein concentration, the combination of WPC with other protein preparations and the influence of various treatments on the protein was also studied. It was conclude that the whey protein concentrate produced in ITAL (WPC) presented the highest immunestimulating power, that the immunestimulation for this preparation remained constant in the range of concentration 7.5 to 20g protein/100g diet, that all the protein sources studied, when mixed with WPC in the diet, showed a negative influence on the immunestimulating power of WPC alone. Heat treatment ($>50^\circ\text{C}$), except pasteurization (72°C , 15 seg), and gamma-irradiation above 3KG, had a negative influence on the immunestimulation by WPC. The dehydration of

the WPC by spray drying did not significantly affect the immunestimulation by WPC. The third chapter aimed at studying the influence of amino acid composition (WPC, CC, and CC-hidrolysates) and, consequently of the structural state of the casein molecules, in the diet consumption, body weight gain, blood protein profile, and on liver glutathione synthesis stimulation. The fourth chapter consists of the nutritional and immunological evaluation of four protein diets (CF, WPC, WPC:CM (50:50) and CM alone) in an otherwise similar composition. For the immunological property, A/Uni mice with 6-8 weeks of age, immunestimated with sheep red blood cells (SRBC), 5×10^6 cells, following determination of the number of plaque forming cells (PFC) 5 days after immunization was used. PFC number indicates the antigen-antibody reaction between the SRBC-antigen and immunoglobulin M formed by the spleen cells. PFC was lowest for CM protein diet, highest for the WPC and CF diets and intermediate for CM/WPC (50:50) diet. No statistic difference was measured between WPC and CF or between WPC/CM and CF ($p > 0.05$), however there was statistic difference ($p < 0.05$) in favour of WPC, compared with CM and WPC/CM (50:50) ($p < 0.05$). Regarding glutathione stimulation, the WPC diet showed the highest activity (8.02 ± 0.59 μ moles GSH/g tissue). No statistic difference was shown between the CF and WPC/CM diets (6.55 ± 0.96 μ moles/g) for liver glutathione. A very strong positive correlation ($CPF = 3.3395 + 9.0913 \times GSH$, $r = 0.94$) between spleen CPF counting (spleen IgM) and liver GSH, was demonstrated for the WPC protein diet. The nutritional parameters such as diet consumption body weight gain, diet efficiency ratio (QEA), apparent protein digestibility (Dap%), protein apparent biological value (BVap%), nitrogen balance (NB), and protein efficiency ratio (PER), they were all high but did not show statistic difference among them ($p > 0.05$). Considering all data this work confirm that protein nutritive value may not represent high functional properties, in this research applied to the immunestimulation and GSH biosynthesis.

CONCLUSÕES GERAIS

O conjunto dos dados apresentados e discutidos nesta tese permitiram formular as seguintes conclusões:

- O concentrado protéico do soro de leite bovino (CSD) e o isolado (REN) apresentaram o maior poder imunoestimulante, dentre todas as fontes protéicas estudadas, o CSD apresentou na faixa de concentração 7,5 a 20% na dieta AIN-93G, a mais elevada imunoestimulação, comparado às outras fontes protéicas estudadas; na combinação com outras proteínas a soroalbumina bovina (BSA) foi a única que não prejudicou o poder imunoestimulante do CSD; em vários casos se observou sinergismo imunológico na mistura de duas ou mais proteínas na dieta; tanto a seqüência de processo como diferentes tratamentos adotados na produção do concentrado e/ou isolado protéico de soro de leite exerceu influência sobre as propriedades imunológicas das proteínas; a hidrólise extensiva (20 e 30% GH) não afetou o valor nutritivo da caseína comercial (CC) em relação ao concentrado CSD; os níveis de proteínas séricas (total e albumina) para a caseína e seus hidrolisados mantiveram-se iguais aos da dieta com CSD, até o 14º dia, tendo-se registrado decréscimo significativo para as dietas com caseína ou hidrolisados, no 28º dia; a hidrólise da caseína não influenciou os níveis de glutathione reduzida (GSH) no fígado que permaneceram inferiores ao do CSD; as fórmulas preparadas para alimentação infantil contendo diferentes fontes protéicas derivadas do leite bovino não diferiram, quanto aos diferentes índices de avaliação nutricional, entre si e com a fórmula comercial (FC), utilizadas como referência; no tocante à glutathione hepática, as dietas CSD e FC não diferiram estatisticamente, seguidas da dieta CSD/CM (50/50%) e por último a dieta CM (caseína micelar); ficou demonstrado a alta correlação positiva entre células formadoras de placa no baço e glutathione no fígado (CFP x GSH), para várias proteínas testadas neste e em outros estudos.

LISTA DE ABREVIACÕES

A/G = relação albumina/globulina
AAr = aminoácidos de cadeias aromáticas
ACE = enzima conversora da angiotensina
ACR = aminoácidos de cadeias ramificadas
ASS = ácido sulfosalicílico
BN = balanço de nitrogênio
BSA = albumina sérica bovina
BSG = globulina sérica bovina
BSO = sulfoximina de butationina
CC = caseína comercial
CEMIB = Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas
CFP = células formadoras de placa
CM = caseína micelar
Con A = concanavalina A
CSD = concentrado de soro doce
CSD-L = concentrado de soro doce liofilizado
CSD-S = concentrado de soro doce desidratado em “spray Dryer”
DAB = 4-dimetilamino benzaldeído
Dap = digestibilidade aparente
EAE = escore de aminoácidos essenciais
FC = produto comercial
FDA = Food and Drug Administration
GH = grau de hidrólise
GMP = glicomacropéptido
GSH = glutatona reduzida
GST = glutatona-S-transferase
HC = hidrolisado de colágeno bovino
HCAs = hidrocarbonetos cíclicos aromáticos
Ig = imunoglobulina

IPS = isolado de proteína de soja
ITAL = Instituto de Tecnologia de Alimentos
Lf = lactoferrina
MHC = complexo de histocompatibilidade principal
NEM = N-etilmaleimida
NK = natural killer
NZ = isolado protéico de soro de leite bovino (Nova Zelândia)
OMS = Organização Mundial da Saúde
PCR = proteína C reativa
PDCAAS = “protein digestibility corrected amino acid scoring”
PER = quociente de eficiência protéica
PHA = fitohemaglutinina
PMGG = proteínas das membranas dos glóbulos de gordura do leite
PSD = pressão sangüínea diastólica
QEA = quociente de eficiência alimentar
Ren = isolado protéico de soro de leite bovino produzido em Rennes
ROS = radicais livres de oxigênio
SDS = dodecil sulfato de sódio
SGI = sistema gastrointestinal
SIDA/AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida
SPF = “specific pathogen free”
SRBC = antígeno específico de eritrócitos de carneiro
TNBS = ácido trinitrobenzenosulfônico
VBap = valor biológico aparente
WPC = concentrado protéico de soro
WPI = isolado protéico de soro

CAPITULO 1

PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS FISIOLÓGICAS DE ALGUMAS PROTEÍNAS ALIMENTÍCIAS: REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

O leite, produto de secreção das glândulas mamárias, é um fluído viscoso formado de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. Possui elevado valor nutritivo, sendo o único alimento que satisfaz às necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie (SGARBIERI, 2004).

A composição do leite é bastante variável entre as espécies, particularmente no que diz respeito aos teores de proteína, gordura e lactose. O leite bovino é composto de 87,5% de água, 3,5% de gordura, 4,5% de lactose, 1,0% de cinza e 3,5% de proteínas (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007). Constitui grande parte da dieta de humanos jovens e adultos e suas proteínas são consideradas de alta qualidade nutricional (BOS; GAUDICHON; TOMÉ, 2000). É fonte de nutrientes e substâncias biologicamente ativas importantes, além de conferir proteção imunológica, tanto para o neonato, com o leite materno, como para o indivíduo adulto.

As proteínas são importantes constituintes dos alimentos podendo perfazer até 40 a 50% de sua composição, considerada em base seca. Sua importância nos alimentos está na dependência de três conjuntos de propriedades (SGARBIERI, 1996; SGARBIERI, 2004), a saber: a) composição e propriedades nutritivas (composição em aminoácidos, digestibilidade, índices de biodisponibilidade e de utilização de seus aminoácidos); b) propriedades físico-químicas e tecnológicas (solubilidade, hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, formação e estabilidade de emulsão e de espuma, geleificação, formação de biofilmes, entre outras); c) propriedades funcionais fisiológicas (imunoestimulante, antitumoral,

antibacteriana, antiviral, antiulcerogênica, antihipertensiva, anticolesterolêmica, entre outras).

O leite e seus derivados protéicos constituem alimentos de elevado consumo pela população sendo matéria prima de primeira necessidade na indústria de alimentos manufaturados.

Os derivados do leite, como o leite desnatado, os queijos e os iogurtes são naturalmente ricos em nutrientes, contendo quantidades apreciáveis de alguns nutrientes essenciais, tais como cálcio, fósforo, vitamina D, proteínas, potássio e magnésio, representando importante contribuição à dieta humana. Também representam fonte significativa de niacina, devido aos teores elevados de triptofano (WOOTEN; PRICE, 2004). A produção do leite em boas condições higiênicas deve ser uma das principais metas de todos os profissionais que atuam, direta ou indiretamente nesta área, visando obter alimentos de alto valor nutritivo e com reduzido risco de veicular agentes nocivos à saúde do consumidor (QUEIROGA et al., 2010).

Fatores como alimentação e manejo dos animais, higiene adequada do recinto, equipamentos e utensílios durante a ordenha, bem como transporte adequado até a indústria podem afetar a cor, sabor, aroma e viscosidade do leite que refletirão na qualidade dos produtos finais (PINNA; LIZIERE, 2000).

O leite tem sido considerado o alimento mais próximo da “perfeição”. É considerado um alimento funcional devido às propriedades especiais atribuídas às suas proteínas, elementos minerais essenciais, lipídios e vitaminas presentes em sua composição (McINTOSH et al., 1998; BRINK, 2002; WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002; SIQUEIRA, et al., 2002; MARSHALL, 2004).

O cálcio é essencial a várias funções biológicas, sendo necessário ao desenvolvimento de ossos e dentes fortes, ao bom funcionamento do coração, nervos e músculos, entre outras funções fisiológicas. A ingestão de cálcio pode ajudar na prevenção de doenças crônicas, que vão desde a osteoporose até a síndrome pré-menstrual (TPM). A ingestão habitual de leite e derivados aumenta o valor nutricional da dieta, na medida em que supre o organismo com o cálcio, além de outros nutrientes benéficos, ao mesmo tempo que aumenta sua utilização

melhorando sua biodisponibilidade (DEVINE; PRINCE; BELL, 1996; INSTITUTE OF MEDICINE, 1997).

Quando se avalia a fonte de cálcio, a quantidade de cálcio presente é mais importante que a biodisponibilidade em si. A eficiência da absorção do cálcio é praticamente similar na maioria dos alimentos, incluindo o leite e seus derivados (COZZOLINO, 2009).

Estudos sugerem que a interação do cálcio com outros nutrientes encontrados nos derivados de leite pode aumentar o efeito protetor do cálcio, nutriente notadamente importante no controle de algumas doenças e na promoção da saúde. O cálcio, o potássio e o magnésio atuam juntos, minimizando os riscos de hipertensão e derrame. Pesquisas demonstram que os maiores benefícios à saúde resultam de sua ingestão veiculada a produtos de laticínios, mais biodisponível do que através de suplementos de cálcio (MASSEY, 2001).

Uma análise da literatura médica discutiu a influência do cálcio derivado de produtos lácteos no risco de obesidade, hipertensão, diabetes tipo II, osteoporose, cálculo renal, alguns problemas decorrentes da gravidez e vários tipos de câncer. Verificou-se que a ingestão de 3 a 4 porções diárias de derivados de leite pode resultar em redução substancial nos custos com os tratamentos de saúde. Observou-se que o aumento na ingestão diária desses produtos resultou na redução anual de 5% na incidência de obesidade, o que correspondeu à redução de 25% em 5 anos, com conseqüente economia de 2,5 bilhões de dólares anuais, projetando economia de 37,5 bilhões em 5 anos. No caso da hipertensão, projetou-se ainda uma redução imediata de 40% na prevalência, resultando na economia anual de 14 bilhões de dólares, correspondendo a 70 bilhões de dólares em 5 anos (McCARRON; HEANEY, 2004).

Embora nesta revisão seja dada ênfase às propriedades das proteínas do leite bovino, outros alimentos protéicos como a soja e concentrados protéicos obtidos do sangue bovino também constituirão objetos de revisão, neste capítulo.

1.2 Proteínas do leite

As proteínas do leite compreendem uma mistura complexa de vários componentes que diferem em quantidade e qualidade entre espécies de mamíferos. As duas frações principais são: as caseínas, que se apresentam principalmente no estado coloidal e proteínas do soro, que estão em solução (SHANBACHER; TALHOUK; MURRAY, 1998; MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 2005; RUSU et al., 2009).

Os componentes bioativos na fração protéica do leite incluem enzimas, compostos bactericidas, hormônios, mediadores da função imune e fatores de crescimento. O primeiro grupo inclui proteínas e polipeptídios bioativos em sua forma nativa tais como a lactoferrina, enzimas (amilase e lipase), imunoglobulinas e hormônios, em concentração maior que no sangue provavelmente relacionada ao importante papel biológico (BOS; GAUDICHON; TOMÉ, 2000; KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

O leite bovino contém 30-35g de proteína/litro. A maior parte destas proteínas são caseínas, organizadas na forma de micelas, contendo 92% de proteína e 8% de sais inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio (SCOTT; ROBINSON; WILBEY, 1998).

Uma terceira classe de proteínas do leite tem despertado muita atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Trata-se das proteínas que formam as membranas dos glóbulos de gordura do leite (PMGG). Essas proteínas são formadas de material protéico e lipídios na proporção 1:1, em número de pelo menos 50 polipeptídios com a massa molecular na faixa de 10 a 300kDa representando 1-2% da proteína total do leite (SPITSBERG; GOREWIT, 1998; MATHER, 2000; JOHNSON et al., 2010). A maioria dessas proteínas apresenta propriedades fisiológicas muito importantes como inibição de vários tipos de câncer, da aterosclerose e agem na prevenção de lesões da mucosa gástrica (SPITSBERG, 2005).

A caseína representa cerca de 80% das proteínas do leite de vaca, sendo que os 20% restantes se encontram no soro. O soro contém uma mistura rica e

heterogênea de proteínas com atributos funcionais, podendo ser utilizadas para fins nutricionais, biológicos e em alimentos. O soro de leite bovino contém de 4 a 7g de proteína/litro, sendo que a concentração real depende do tipo de soro (ácido ou doce), estágio de lactação e condições de processamento usados na produção do queijo ou da caseína (FONSECA et al., 1999; BORGES et al., 2001).

As proteínas do leite apresentam um quociente de eficiência protéica (PER) elevado. A caseína, considerada proteína de referência, apresenta um PER acima de 2,5 e o caseinato de sódio, 2,6 (MING, 2000; MUGHAN, 2005; AUGUSTIN; MUNÕZ, 2006). As análises do valor nutricional de caseinato de sódio e coágulo de caseína, produzidos em planta-piloto do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP, apresentaram valores de PER iguais a 3,15 e 3,65, respectivamente (BORGES et al., 2001). As proteínas do soro de leite apresentam propriedades fisiológicas importantes, sendo melhor fonte de energia e de aminoácidos quando comparadas às proteínas do ovo, carne, soja ou até à caseína (SGARBIERI, 1996). Qualquer fator que altere a digestibilidade das proteínas poderá afetar seu valor nutricional. A excelente eficiência nutricional das proteínas do soro de leite é responsável pelo seu alto valor biológico (FRIEDMAN, 1996; SCHAAFSMA, 2005; SOLTAN, 2009).

1.2.1 Caseínas

A caseína pode ser definida, de maneira simplificada, como sendo a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado em pH 4,6, a 20 °C. As proteínas que permanecem em solução, nestas condições, podem ser obtidas por precipitação com sulfato de amônio. Essas proteínas encontram-se em forte associação devido à combinação de fatores como regiões hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e hidrostáticas (SGARBIERI, 1996).

Consistem em um grupo heterogêneo de fosfoproteínas que podem ser isoladas por procedimentos físicos e químicos, como centrifugação do leite para separar as micelas de caseína, filtração em gel, hidrólise enzimática limitada da κ -caseína e o método clássico de precipitação isoelétrica, em pH 4,6, entre 20 e

35°C, seguido de centrifugação para recolher o precipitado de caseínas. As caseínas do leite bovino compreendem quatro frações: α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína, nas proporções de 44, 13, 33 e 10%, respectivamente (XU, 1999).

A caseína α_{s1} apresenta forte tendência à interação hidrofóbica, sugerindo que essa proteína exerça função importante na formação das micelas de caseína. A sequência de aminoácidos da β -caseína revela um segmento amino terminal com elevada densidade de carga negativa, bastante hidrofílico, apresentando quatro grupos fosfato no segmento 15-19. O restante do polipeptídeo é fortemente hidrofóbico, contendo alta concentração de prolina. As κ -caseínas não reagem com o Ca^{++} mas, em presença desses íons, reagem com as α_{s1} e com as β -caseínas para formar micelas termodinamicamente estáveis (MODLER, 2000).

Ao contrário das séries α_{s1} e β , as cargas das κ -caseínas não são provenientes do fosfato, o que provavelmente explica a não reatividade da κ -caseína com o cálcio. As cargas negativas da extremidade C-terminal da molécula são reforçadas pela presença de resíduos de carboidratos. A κ -caseína constitui substrato para a ação da renina. A clivagem ocorre entre os resíduos Phe₁₀₅-Met₁₀₆, liberando um peptídeo C-terminal, glicomacropeptídeo (GMP) de PM 6.800 Da, solúvel e um peptídeo N-terminal, p- κ -caseína insolúvel, de 12.271Da. A grande hidrofobicidade inerente à para- κ -caseína favorece a agregação das micelas de caseína após a ação da renina (SGARBIERI, 1996; KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

O termo micelas tem sido usado para designar as partículas dispersas do leite formadas de uma mistura complexa de proteínas. A caseína micelar pode ser utilizada na produção de peptídeos biologicamente ativos, tais como β -casomorfina, fosfopeptídeos e peptídeos envolvidos na imunomodulação (FITZGERALD, 1998; PAUIN, 1998). Além de caseína, as micelas contêm elevada percentagem de fosfato de cálcio coloidal associado através de ligações não covalente (KRIF, 1999; SPREER, 1998).

As micelas são formadas por submicelas, aproximadamente esféricas, agregando várias moléculas de caseína, na seguinte proporção: α_{s1} : α_{s2} : (β + γ): κ = 4:1:4:1 mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. Além disso,

o citrato e principalmente o fosfato de cálcio coloidal são componentes que integram e coletivamente estabilizam a micela (MORENO et al., 2000).

As caseínas apresentam resíduos de serina-fosfato (nas frações $\alpha s1$ -, $\alpha s2$ -, and β -caseínas) que contribuem para a estabilidade de suas micelas. Também apresentam alto teor de prolina, uniformemente distribuída na cadeia polipeptídica, o que limita a formação de estrutura secundária em α -hélice ou β -pregueada. Assim, as caseínas apresentam estruturas mais abertas do que as proteínas do soro, tornando-as muito mais susceptíveis à proteólise (MARSHALL, 2004; SINDAYIKENGERA; WENSHUI, 2005).

Existem diversas variantes genéticas das caseínas e as diferentes variantes influenciam a carga, o peso molecular e o ponto isoelétrico. A caseína $\alpha s1$ tem quatro variantes genéticas (A, B, C e D). A $\alpha s2$ também apresenta quatro variantes: P_{10} ($\alpha s6$), P_{11} ($\alpha s4$), P_{12} ($\alpha s3$) e P_{13} ($\alpha s2$). A β -caseína tem cinco variantes: A^3 , A^2 , A^1 , B e C, enquanto que a κ -caseína tem duas, A e B. A caseína é um dos produtos mais importantes derivados do leite, essencial na produção de muitos alimentos formulados como bebidas, queijos processados, produtos para confeitarias, indústria de chocolates, produtos fermentados, sobremesas, pastas, sopas, cereais matinais e produtos cárneos. Além do alto valor nutritivo, as caseínas conferem aos produtos formulados melhor aparência e melhores propriedades sensoriais, em virtude de suas propriedades funcionais tecnológicas (EARLY, 1998).

As caseínas são de natureza anfotérica, possibilitando reações desejáveis em sistemas alimentícios, nas interfaces óleo-água e ar-água como componente de sistemas funcionais ou pelo aumento do valor protéico do produto final (MODLER, 2000).

- **Propriedades funcionais fisiológicas**

O principal papel conhecido das caseínas até algum tempo atrás, era como fonte dos aminoácidos necessários ao crescimento do recém-nascido. Holt (1997) propôs como função fisiológica principal do sistema micelar da caseína, a

prevenção da calcificação patológica nas glândulas mamárias, uma vez que o cálcio e o fósforo ligados à micela de caseína são assim transportados ao organismo da criança sem haver perigo de precipitação de cálcio nos tecidos produtores de leite.

Embora a caseína íntegra tenha sido comumente usada como um estimulante em exudação inflamatória ou quimiotaxia de leucócitos (EL-NAGGER et al., 1980; METCALF et al., 1986), dietas de caseína tem mostrado proteção contra o desenvolvimento de câncer intestinal, em ratos (McINTOSH et al., 1995).

A β -caseína e seus peptídios opióides, conhecidos como β -casomorfina apresentam atividades imunomodulatórias como promoção da síntese de anticorpos e fagocitose (SINDAYIKENGERA; XIAWENSHUI, 2005).

As β -casomorfina apresentam receptor celular do tipo (μ) e seus efeitos fisiológicos, em recém-nascidos e animais no período de amamentação, vão desde a regulação da absorção de nutrientes ao desenvolvimento do sistema nervoso central (MIGLIORE-SAMOUR, JOLLÈS, 1988; FIAT, JOLLÈS, 1989; SINDAYIKENGERA; XIAWENSHUI, 2005). Um peptídio da β -caseína (Pro.Gly.Pro.Ile.Pro.Asn) correspondendo à seqüência 60-70 da molécula íntegra, mostrou-se imunologicamente análogo ao hexa peptídio (Val.Glu.Pro.Ile.Pro.Tyr) da β -caseína humana, que foi capaz de estimular fagocitose em camundongo (MIGLIORE-SAMOUR, JOLLES, 1988; FIAT; MIGLIORE-SAMOUR; JOLLÈS, 1993).

Algumas das β -caseínas bovinas apresentam 47% de sua seqüência de aminoácidos correspondendo ao da β -caseína humana (FIAT, JOLLÈS, 1989), portanto, é de se supor que ambas as caseínas apresentem outras propriedades imunológicas em comum.

Wong, Camirant e Pavlath (1996) demonstraram que a β -caseína apresentou efeito inibitório sobre a quimiotaxia de neutrófilos de ovinos e um efeito estimulante da produção de peróxidos pelos neutrófilos. Apresentou também efeito estimulatório na proliferação de linfócitos T e B em resposta a estímulo mitogênico e produção de IL-1 β por macrófagos. Esses pesquisadores concluíram que as β -caseínas bovina apresentam efeito seletivo no sistema inato e adaptativo. Estudo

“in vitro” sugeriu que a β -caseína é imunomoduladora sendo particularmente imunoestimulatória. Contudo, a β -caseína bovina parece ter um efeito supressivo sobre o sistema imunológico.

As caseínas apresentam potente atividade antimutagênica, o que é importante pela correlação existente entre mutagênese e carcinogênese (RUSU et al., 2009). Vários pesquisadores descreveram as caseínas, como dos mais potentes antimutagênicos entre outras proteínas usando o teste de AMES modificado (JONGEN, 1987). O aquecimento da caseína a 130 °C por 20 min não alterou sua capacidade antimutagênica, porém, a mutagenicidade diminuiu após ação da tripsina no estômago e, quando hidrolisada em seus aminoácidos, sua capacidade antimutagênica foi totalmente perdida (HOSONO et al., 1988). Van Boek e colaboradores (1993) demonstraram que a caseína exerceu efeito antimutagênico contra diversas substâncias.

De acordo com Bosselaers e colaboradores (1994) a caseína e a albumina de soro bovino (BSA), mas não o WPC, a β -lactoglobulina e o isolado de proteína de soja (IPS), apresentaram efeito antimutagênico, através de medidas do reparo de DNA em células de mamífero. A caseína, mas não o IPS, mostrou-se antimutagênica em intestino delgado de camundongo alimentados com os dois tipos de proteína juntamente com substâncias mutagênicas (GOEPTAR et al., 1997).

As propriedades antimutagênicas das caseínas estão associadas com suas estruturas moleculares que permitem a acessibilidade dos mutagênicos e não a sua composição de aminoácidos (VAN BOEKEL et al., 1993; BOSSELAERS et al., 1994; GOEPTAR et al., 1997).

Caseína total e suas frações constituintes ligam-se avidamente com hidrocarbonetos cíclicos aromáticos, HCAs, que são mutagênicos (YOSHIDA, XIUYUN, 1992), porém o significado fisiológico desta complexação após digestão da proteína ainda não foi estabelecido. É interessante o fato de que produtos de leite ricos em proteínas, quando aquecidos produzem baixos níveis de HCAs mutagênicos comparados com produtos de carne, provavelmente em função dos

baixos níveis de creatina e creatinina, importantes reagentes nas reações de formação de compostos mutagênicos (OVERVIK, GUSTAFSON, 1990).

Gourley, Kreamer e Cohnen (1997) em estudo com crianças mostraram que fórmula com hidrolisado de caseína inibiu a atividade da β -glicuronidase intestinal. Os carcinógenos são inativados no fígado pela conjugação com ácido glicurônico, convertendo-os em metabólitos hidrossolúveis dos quais parte destes entra na circulação e através dos rins são excretados na urina enquanto, o restante é secretado na bile e chega ao intestino onde a β -glicuronidase bacteriana pode clivar o conjugado e liberar o carcinógeno. Govers e colaboradores (1993) verificaram, em ratos, que dieta à base de proteína de soja produz maior dano epitelial e proliferação do epitélio colônico (fatores de risco para o câncer de cólon) do que dieta com caseína. Esses achados estão de acordo com os obtidos por Dias e colaboradores (2006), em modelo de câncer de cólon em camundongos tratados com azoximetano como carcinógeno e dietas à base de IPS, caseína bovina e WPC. O grau de proteção, tanto para lesões pré-cancerígenas como para carga tumoral foi, IPS < caseína < WPC.

Uma excelente revisão sobre atividade antitumoral das proteínas do leite foi publicada por Parodi (2007).

- Peptídios bioativos

Vários peptídios existentes na seqüência de aminoácidos das caseínas já foram estudados. Os peptídios bioativos mais importantes são as casomorfina, com atividade opióide por se ligarem a receptores opióides no epitélio intestinal e em outras células (SCHLIMME; MEISEL, 1995; SINDAYIKENGERA; XIAWENSHUI, 2005; HARTMANN; MEISEL, 2007); antagonistas opióides (FIAT; MIGLIORE-SAMOUR; JOLLÈS, 1993; KORHONEN; PIHLANTO, 2006); peptídios com atividade imunoestimulante (ELLIS; MASTRO; PICCIANO, 1996; SCHANBACHER et al., 1998); peptídios com atividade anti-hipertensiva; e fosfopeptídios com habilidade para seqüestrar cálcio (SGARBIERI, 1999), ferro (BOUHALLAB; LÉONIL; MAUBOIS, 1991; PÉRÈS et al., 1997; AÎT-OUKHATAR et

al., 1999; 2000) e, possivelmente, outros minerais, agindo como carreadores de substâncias bioativas.

A habilidade dos fosfopeptídios de caseína ligarem cálcio já é bem conhecida, mas não está claro se esses peptídios são efetivos no estímulo do metabolismo de cálcio como transporte, absorção e/ou utilização na mineralização óssea (JELEN; LUTZ, 1998).

Os resíduos fosfoseril das caseínas se ligam fortemente ao ferro (SINDAYIKENGERA; WENSHUI, 2005), tornando-se solúveis no pH alcalino do duodeno (BOUHALLAB; LÉONIL; MAUBOIS, 1991), o que previne a precipitação do ferro durante a digestão, melhorando sua absorção (HURRELL, 1997).

1.2.2 Proteínas do soro de leite

O soro é a fração do leite obtida após retirada das caseínas (HOFFMAN; FALVO, 2004), contendo uma mistura de proteínas, lactose, sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio e zinco), vitaminas e traços de gordura. A composição dos produtos de soro varia de acordo com o tipo de leite e tipo de queijo e processo de obtenção (USDA, 2003). O descarte final do soro de forma racional é um dos maiores problemas enfrentados por boa parte das indústrias de laticínios, principalmente as de pequeno e médio porte que, em sua grande maioria, o descartam diretamente na rede pública, rios ou lagos, sem nenhum tratamento prévio, causando sérios riscos ao meio ambiente, uma vez que não possui condições de absorver uma carga poluidora extremamente rica em elementos orgânicos (SIQUEIRA et al., 2002). Há três tipos de produtos protéicos de soro resultante de várias técnicas de processamento: soro em pó, concentrado e isolado protéico (HOFFMAN; FALVO, 2004).

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três maneiras principais: pelo processo de coagulação enzimática (quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijo e no soro “doce”; precipitação ácida no pH isoelétrico (pH 4,6, 20°C), resultando na caseína isoelétrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; separação

física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas de soro, na forma de concentrado ou isolado protéico (SGARBIERI, 2004). O “soro ácido” é obtido por precipitação ácida das caseínas enquanto que aquele obtido pela coagulação enzimática das caseínas é conhecido tradicionalmente como “soro doce” (HUFFMAN; HARPER, 1999).

O processamento do leite desnatado por microfiltração (diâmetro de membrana 0,2µm) permite fracioná-lo em um permeado que contém a maioria das proteínas do soro e baixa concentração de lipídios e um retentado, consistindo de caseína nativa, na forma micelar. O tratamento posterior do retentado por diafiltração resultará em um preparado de caseína com mais de 90% de pureza, podendo substituir, com vantagens, o caseinato de sódio em suas aplicações (MAUBOIS; OLIVER, 1992).

O soro apresenta composição média de 6,9% de sólidos totais; 0,6% de sais minerais; 0,3% de gordura; 0,9% de proteínas, 5,0% de lactose e 0,2% de ácido láctico, resultante da fermentação da lactose (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006). Dessa forma, o volume de descarte anual equivale a aproximadamente 24.300 toneladas de sais minerais, 36.450 toneladas de proteínas, 12.150 toneladas de gordura e 202.000 toneladas de lactose, demonstrando que o problema relacionado à poluição ambiental é bem mais sério do que se imagina. Por outro lado, são lançados ao meio ambiente grande quantidade de proteína e de gordura que poderiam ser aproveitadas na elaboração de ricota, achocolatados, bebidas lácteas e em alimentação animal, além da possibilidade de utilização como nutriente em meios de cultura para processos fermentativos (FLORENTINO et al., 2005; SARON et al., 2007).

Devido ao elevado teor de água e reduzido teor de proteínas, de 0,6 a 0,9%, o uso de soro lácteo em produtos alimentícios convencionais ainda é limitado, principalmente pelo custo de secagem. Já na forma desidratada, o soro contém 12% de proteína, 3% de gordura, 10% de minerais e 75% de lactose (WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996; WONG et al., 1996).

Os valores médios de pH encontrados em soros resultantes de produção de queijos assemelham-se àqueles verificados com o soro doce, 6,1-6,5 (MORR;

FOEGEDING, 1990), possibilitando vasta aplicação do soro como ingrediente em alimentos funcionais e/ou elaboração de produtos fermentados. A quantidade de proteínas encontrada em soros de queijo de coalho variou de 1,78 a 1,82% (FURTADO, 1991; TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

A expressão “proteínas de soro” engloba várias proteínas diferentes, que incluem a β -lactoglobulina, α -lactalbumina, as imunoglobulinas, a albumina sérica bovina, a lactoferrina e a lactoperoxidase, além de fosfopeptídios e glicomacropeptídios, derivados das caseínas no soro de queijo (SHAN, 2000; KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Estudos “in vitro” e/ou com animais experimentais identificaram atividades biológicas específicas para cada uma dessas proteínas. A β -lactoglobulina é uma proteína ligadora de retinol, desempenhando papel na absorção e disponibilidade de vitamina A (HARPER, 2000). A α -lactalbumina, que corresponde a 25% das proteínas totais do soro, é utilizada em fórmulas infantis comerciais similares ao leite humano (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002) e está presente no leite de todos os mamíferos (LÖNNERDAL; ERIC; LIEN, 2003). Essa proteína também liga cálcio, zinco e outros minerais (HARPER, 2000).

As imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgA e IgM) também exercem atividades antimicrobianas, podendo neutralizar toxinas e vírus (SHAN, 2000). A lactoferrina é muito pesquisada sendo uma proteína ligadora de ferro (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002; USDEC, 2003). Várias funções biológicas são descritas para a lactoferrina, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, imunomoduladora, anticâncer e antioxidante, além da ação prebiótica estimulando o crescimento de bactérias benéficas no intestino. Seu principal uso é em fórmulas infantis maternizadas (NAIDU, 2000).

A albumina sérica bovina (BSA) é derivada do sangue materno e chega ao leite via mecanismo de transporte celular, por meio dos vasos sanguíneos na glândula mamária (HUFFMAN, 1996; BEAULIEU; DUPONT; LEMIEUX, 2006). A concentração de albumina no soro de leite aumenta em caso de mastite. A função dessa proteína no leite é desconhecida, embora seja conhecida a capacidade de ligar ácidos graxos e outras moléculas menores (WALZEM; DILLARD; GERMAN,

2002). A BSA corresponde a cerca de 10% das proteínas de soro de leite. É uma proteína de alto peso molecular, rico em cistina (aproximadamente 6%) e relevante precursor da síntese de glutathione. Possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídios, favorecendo seu transporte na corrente sanguínea (GOLD; BOUNNOUS, 1993; DE WIT, 1998; HARAGUCHI; ABREU, DE PAULA, 2006). A BSA desnaturada pode reduzir a probabilidade de o indivíduo desenvolver algumas doenças, tais como diabetes dependente de insulina e doenças auto-imunes (STRAND, 1995; BEAULIEU; DUPONT; LEMIEUX, 2006; KRISSANSEN, 2007).

As proteínas de soro correspondem, aproximadamente, a 20% das proteínas totais do leite bovino sendo muito valorizadas e, devido ao seu teor de aminoácidos essenciais, seu valor nutritivo é maior do que outras proteínas da dieta (SHAN, 2000).

A superioridade nutricional das proteínas de soro, em relação à de outras proteínas, para a nutrição humana está relacionada, também, ao perfil de aminoácidos. Essas proteínas apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SHAN, 2000; SGARBIERI, 2004). Os aminoácidos sulfurados são importantes para a biosíntese de glutathione, um tripeptídeo com propriedades antioxidante, anticarcinogênica e imunomoduladora. Proteínas de soro são também boas fontes de aminoácidos de cadeia ramificada como isoleucina, leucina e valina (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002).

As proteínas do soro são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese protéica sanguínea e tecidual a tal ponto que alguns pesquisadores classificaram essas proteínas como proteínas de metabolização rápida, muito adequadas para situações de estresse metabólico em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (BOIRIE et al., 1997; DANGIN et al., 2001). Essas proteínas representam a melhor fonte natural de aminoácidos de cadeia ramificada, os quais podem estimular a síntese de

proteína muscular, ajudando a minimizar a perda de proteína em condições de catabolismo acelerado, o que é interessante no caso de atletas (SHAN, 2000).

A prescrição correta da terapia nutricional para o paciente grave depende do entendimento da resposta metabólica decorrente da agressão aguda, conforme ocorre nos casos de trauma, choque, sepse e inflamação sistêmica. Ocorre nessas situações uma resposta generalizada, em que há mobilização de energia para estimular a função imune e o reparo dos tecidos lesados, o que se dá à custa do consumo de massa magra e do aumento da perda urinária de nitrogênio. Os aminoácidos são mobilizados do músculo esquelético, tecido conjuntivo e intestino, para promover a cicatrização das feridas e para a síntese hepática de proteínas de fase aguda, além de tornarem-se substrato para a gliconeogênese (PICCOLO et al., 2002; CORTES et al., 2003; VANNUCCHI; MARCHINI, 2007).

As necessidades protéicas do paciente hipercatabólico são grandes e o balanço nitrogenado é o parâmetro nutricional isolado mais consistentemente associado à melhora do prognóstico. Recomenda-se para estes pacientes o fornecimento de 1,5 a 2g/kg/dia de proteína. Vários estudos mostram que 1,25 g/kg/dia promove melhora do balanço nitrogenado (RIBEIRO, 2004).

- **Concentrados e isolados protéicos de soro de leite**

Os concentrados protéicos de soro (WPC) estão disponíveis em níveis de proteína entre 34 a 85%. Este produto contém lactose, gordura e minerais. Com o aumento da proteína, a porcentagem de lactose no concentrado protéico de soro diminui. Nos Estados Unidos os concentrados eram produzidos inicialmente visando minimizar a poluição sendo usado para alimentação animal e como ingrediente na formulação de alimentos para humanos. Concentrados com mais de 80% de proteína são utilizados na formulação de produtos cárneos, panificação, sopas e surimi, além de vários produtos de confeitaria (HUFFMAN, 1996; EL-SALAM; EL-SHIBINY; SALEM, 2009).

Os isolados protéicos de soro (WPI) contêm, no mínimo, 90% de proteína em base seca, menos de 1% de gordura e lactose e cerca de 2% de cinza. Eles

podem ser preparados por troca iônica ou por processo de ultrafiltração com utilização de membranas. Além de utilizados nas mesmas aplicações que os concentrados de soro com alto teor protéico, os isolados são muito utilizados em bebidas energéticas para atletas e em produtos para dietas especiais (YEE; WILEY; BAO, 2007).

Os isolados protéicos de soro podem ser aquecidos com ácidos ou tratados com enzimas proteolíticas para formar hidrolisados protéicos de soro. Como resultado de novas tecnologias, uma variedade de aminoácidos, peptídios e frações biologicamente ativas puderam ser isolados das proteínas de soro (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002).

Os isolados compreendem as fontes mais puras de proteínas disponíveis. Durante o processamento dos isolados protéicos há uma remoção significativa de gordura e lactose. Como resultado, indivíduos que são intolerantes a lactose podem ingerir com segurança esses produtos (GEISER, 2003). Embora a concentração de proteína dos isolados seja maior, algumas vezes pode haver desnaturação protéica devido aos processos de obtenção utilizados. Essa desnaturação acarreta redução nas propriedades funcionais biológicas das proteínas (HOFFMAN; FALVO, 2004; PHILIPINA; RIZVI, 2008; LANDS et al., 2010).

A produção e a composição dos concentrados e isolados protéicos de soro de leite bovino foi bastante pesquisada nos últimos anos (MORR; FOEGEDING, 1990; JAYAPRAKASHA; PATEL; RENNER, 1993; 1994; EL-SALAM; EL-SHIBINY; SALEM, 2009). O concentrado protéico de soro de leite representa uma variada mistura de proteínas com propriedades físicas, químicas e funcionais, desempenhando papel importante na nutrição, como uma fonte excepcionalmente rica e balanceada de aminoácidos essenciais (REGESTER; McINTOSH; LEE, 1996; SMITHERS et al., 1996). Trata-se de sistema multifuncional que é adicionado a diversos alimentos visando aumentar seu valor nutricional e melhorar as propriedades funcionais de geleificação, viscosidade, estabilização de emulsões ou espumas, entre outras (MORR; HÁ, 1993; JAYAPRAKASHA; BRUECKNER, 1999).

O WPC é obtido por ultrafiltração do soro ácido ou doce e seco em “spray dryer” para manter a funcionalidade das proteínas. É possível obter-se um WPC com >80% de proteínas por meio de ultrafiltração e diafiltração seguido de secagem por atomização. A desnaturação promovida nas proteínas de soro varia de 14,3 a 21,7% (RALKIN et al., 2007). O WPC com 34% de sólidos totais apresenta uma composição semelhante à do leite desnatado em pó, diferenciando-se no perfil de minerais e no tipo de proteína (JAYAPRAKASHA; BRUECKNER, 1999).

Os teores médios de cinza, lactose e gordura no WPC variam, significativamente, dependendo do conteúdo de proteína (JAYAPRAKASHA; PATEL; RENNER, 1994). Nos Estados Unidos fixaram-se os seguintes padrões para a composição do WPC: proteína (mínima 25%), gordura 0,2-10%, 2-15% de cinza; máximo de 60% de lactose e 1-6% de umidade (RENNER; ABD EL-SALAM, 1991).

Com o desenvolvimento das tecnologias de fracionamento em membranas e com as descobertas da importância das proteínas do leite em ciência e tecnologia de alimentos e na nutrição, houve um forte incremento das pesquisas, procurando intensificar o uso mais adequado dessas proteínas (WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996; BOUNOUS, 1997; HUFFMAN, HARPER, 1999).

Uma das primeiras aplicações de sistemas de membrana na indústria foi na produção de concentrados protéicos de soro. A ultrafiltração e a osmose reversa são muito utilizadas para concentrar proteínas de soro, permitindo o desenvolvimento de um grande leque de concentrados protéicos (PEARCE, 1992; SILVA, 2010), utilizando-se também diversas outras tecnologias como filtração, centrifugação, evaporação, secagem, tratamento térmico, fermentação, adição de ingredientes, desmineralização, cristalização entre outras (SIQUEIRA et al., 2002). Outras pesquisas interessantes referem-se ao fracionamento de proteínas do soro e a separação de frações protéicas, com propriedades funcionais específicas (ROSEMBERG, 1995).

A ultrafiltração é um processo semelhante à filtração tradicional. Devido à diferença de pressão aplicada, as moléculas de solventes e solutos de menor

tamanho permeiam através dos poros da membrana, enquanto outras moléculas e partículas de maior tamanho são retidas. Os diâmetros dos poros destas membranas encontram-se na faixa entre 0,05µm e 1µm. Geralmente, a ultrafiltração é empregada para a separação de macromoléculas com peso molecular superior a 1kDa (RODRIGUES et al., 2003).

Uma membrana pode ser definida como uma barreira seletiva, sólida ou líquida, que separa duas fases e restringe o transporte de uma ou várias espécies químicas, de maneira específica. Esse transporte pode ocorrer por difusão ou convecção, e é induzido por um gradiente de potencial químico (pressão, concentração e temperatura) ou potencial elétrico. A maioria das membranas comerciais de ultrafiltração é constituída de materiais poliméricos, como, por exemplo: polisulfona, poli (éter-sulfona), derivados de celulose e poli (éter-imida) e poliacrilonitrila (MULDER, 1991).

As tecnologias de filtração por membranas envolvem a passagem do soro fluido juntamente com seus componentes solúveis por uma membrana semipermeável. Por meio de um gradiente de pressão através da membrana, as moléculas menores, capazes de permear a membrana, são separadas. As moléculas e/ou partículas maiores não conseguem atravessar a membrana, sendo continuamente concentradas, até que se consiga alcançar o fator de concentração (FC) pré-determinado. Com o uso de membranas com tamanhos de poros ou valores de peso molecular de corte diferentes, torna-se possível separar ou concentrar seletivamente os componentes do soro. No processo, quase toda a proteína é retida, sendo que o seu teor no retentado aumenta com o fator de concentração (SPREER, 1998). Essa tecnologia permite obter concentrados de caseína e de proteínas de soro, além de proteínas nativas isoladas, conservando a qualidade do produto (PUNIDADAS; RIZVI, 1998).

O processo de microfiltração utiliza membranas de 1,4 a 0,8µm de porosidade e permite a exclusão quase total de microorganismos do soro, ajudando também na remoção de lipídios residuais, com conseqüente aumento das propriedades funcionais dos concentrados protéicos (JAYAPRAKASHA; BRUECKNER, 1999).

- **Propriedades funcionais fisiológicas**

Entre algumas das propriedades funcionais fisiológicas atribuídas às proteínas de origem alimentícia, particularmente às do soro de leite, destacam-se: propriedades imunoestimulantes (BOUNOUS; KONGSHAVN, 1985; BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989; GILL; RUTHERFURD, 1998; SGARBIERI, 2004); propriedade antitumoral (BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1991; McINTOSH et al., 1995; BOUNOUS, 2000; TSUDA; SEKINE, 2000; PARODI, 1998; DIAS, 2004); propriedade antihipertensiva (SGARBIERI, 1999; ARIYOSH, 1993); efeito hipocolesterolemizante (NAGAOKA et al., 1992; JACOBUCCI, 1999; JACOBUCCI et al., 2001); ação antibacteriana e antiviral (KONDO et al., 1992; OUWEHAND et al., 1997; TSUDA; SEKINE, 2000; SGARBIERI, 2004); absorção de minerais essenciais, ação antioxidante (KITTS; YUAN, 1992; KITTS; WEILER, 2003; SGARBIERI, 2004; KITTS, 2005; KITTS; NAKAMURA, 2006) e ação anticariogênica (WARNER; KANEKAMIAN; ANDREWS, 2001).

Os efeitos biológicos e fisiológicos das proteínas do soro de leite são atribuídos às frações α -lactalbumina, β -lactoglobulina, soroalbumina, lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, além de uma pequena quantidade de substâncias bioativas, incluindo hormônios, fatores de crescimento celular e citocinas, que estão presentes em concentrações que podem ser consideradas significativas para oferecer benefícios ao organismo. Estas frações protéicas foram implicadas em inúmeros efeitos biológicos observados em estudos com humanos e animais (McINTOSH et al., 1998; PARODI, 1998).

As concentrações dos componentes do soro de leite responsáveis pelas propriedades funcionais fisiológicas observadas em inúmeros estudos já foram determinadas. Na molécula da albumina do soro bovino encontram-se 17 resíduos de cistina e 6 seqüências de ácido glutâmico-cistina. Na lactoferrina há 17 resíduos de cistina e 4 seqüências de ácido glutâmico-cistina. Na α -lactalbumina 4 resíduos de cistina e na β -lactoglobulina, 2 resíduos de cistina. Ficaram evidenciadas as frações que contêm aminoácidos sulfurados, considerados importantes pelo efeito do soro de leite bovino na saúde (BARUCHEL et al., 1998).

Pesquisas realizadas em diferentes modelos experimentais (com animais, humanos e “in vitro”) utilizando a proteína do soro de leite têm comprovado sua eficácia no organismo, incluindo efeito imunomodulador, ação antibacteriana e antiviral, estímulo à absorção e função intestinal, aumento da absorção de minerais, melhores respostas no combate às infecções e processos inflamatórios, promoção da síntese de glutathione, além de efeito citoprotetor da mucosa gástrica (BOUNOUS et al., 1993; KENNEDY et al., 1995; BRINK, 1996; PARODI, 1998; ROSANELI et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2001; CASTRO et al., 2010).

Dietas contendo concentrados protéicos de soro de leite estimularam a síntese de imunoglobulina M (IgM) e de glutathione, respectivamente, no baço e no fígado de camundongos da linhagem A/Uni, efeitos estes mais acentuados do que com outras proteínas testadas. Encontrou-se forte correlação linear positiva ($r = 0,998$) entre células do baço produtoras de IgM e as concentrações de glutathione no fígado (DIAS, 2004). Em estudos prospectivos duplo-cego, 18 crianças entre 1 e 6 anos de idade, portadoras de HIV foram suplementadas com WPC ou placebo (maltodextrina) por 4 meses. Observou-se uma elevação da síntese de glutathione eritrocitária e redução na ocorrência de episódios infecciosos no grupo suplementado com WPC (MORENO, 2002).

A ação imunoestimulatória foi verificada tanto com os concentrados e isolados protéicos de soro, como com as proteínas isoladas do soro, como: imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, glicomacropeptídeo (GMP). Este último só é encontrado no soro doce, como produto da ação da enzima coagulante quimosina sobre κ -caseína. Além de estar presente no soro, a lactoferrina é secretada por neutrófilos, podendo estimular o crescimento de vários tipos de células do sistema imune como linfócitos, macrófagos/monócitos, além de estimular a resposta imune humoral (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002).

O efeito das proteínas de soro na modulação da síntese protéica foi bastante investigado. Tanto o envelhecimento como a presença de várias patologias podem acarretar queda na síntese de proteínas e, conseqüentemente, comprometer o desempenho de suas funções, afetando os processos fisiológicos e patológicos do organismo (BRINK, 2002).

- **Imunomodulação**

Uma das propriedades funcionais fisiológicas estudadas e importantes, exercidas por proteínas do soro de leite, se relaciona com seu poder imunomodulador. Nas últimas duas décadas, foram relatados vários estudos sobre o efeito da utilização de fontes alimentares protéicas para induzir maior ativação dos processos imunes e diminuição dos processos patológicos (BOUNOUS; GOLD, 1991; BOUNOUS et al., 1993; BRINK, 1996; SGARBIERI, 1996).

Desde sua descoberta em 1888, a glutathione é pesquisada por apresentar várias funções biológicas. Em 1929, Hopkins e Rendall descobriram que a glutathione é um tripeptídeo, composto por três aminoácidos, cisteína, glicina e ácido glutâmico, formando L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, presente em maior ou menor concentração em todas as células do organismo humano e animal, que exerce sua atividade bioquímica através do grupamento sulfidril de sua estrutura (MEISTER, 1991; COTGRAVE; GERDES, 1998), sendo o cofator para as reações da glutathione S-transferase (GST) (TORRES; SOARES; MAIA, 2004).

Tendo em vista que todos os organismos vivos estão continuamente expostos a compostos químicos, os xenobióticos, vários mecanismos de proteção foram desenvolvidos durante o processo evolutivo contra o dano provocado por esses compostos. Os animais mais evoluídos como o homem, desenvolveram no fígado um mecanismo enzimático que intercepta os xenobióticos, transformando-os em substâncias mais hidrossolúveis, facilmente excretadas do organismo (KALANT, 1991), impedindo seu acúmulo e, conseqüentemente, o surgimento de danos no material genético (TORRES; SOARES, PEREIRA, 2006).

O metabolismo de xenobióticos “in vivo” consiste de dois passos principais. O primeiro relaciona-se à bioativação ou biotransformação desses compostos mediada pelas enzimas hepáticas da fase 1, como as enzimas da família do citocromo P450 monooxigenases. O segundo passo envolve a conjugação e a desintoxicação primária, mediadas por enzimas da fase 2, incluindo a glutathione-S-transferase (GST), UDP-glucuronosiltransferases e sulfotransferases (YONG WU et al., 2004).

A GST constitui o principal grupo de proteínas solúveis do fígado, envolvidas na desintoxicação celular de compostos eletrofílicos, gerados intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos. Sua maior concentração é observada no fígado, mas também se encontra em menores concentrações nos pulmões, intestino delgado e outros órgãos. Essas proteínas são encontradas em diferentes formas, chamadas de isoenzimas (HAYES; PULFORD, 1995). Sua ação desintoxicadora é importante na proteção contra estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas, incluindo aquelas associadas com o envelhecimento (BABBITT, 2000).

Os xenobióticos, à semelhança do que acontece com as substâncias endógenas, são conjugados com diversas substâncias. Entre as reações importantes, tem-se a sulfatação, a acetilação, a metilação, além de conjugações com a GSH e com aminoácidos. A conjugação de agentes tóxicos com a GSH é catalisada, na sua fase inicial, pela GST que atua na fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e outras macromoléculas (MALMEZAT et al., 2000; DYBING et al., 2002).

As GSTs do citoplasma dos mamíferos são todas diméricas com subunidades de 199-244 aminoácidos (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Estima-se que existam, pelo menos, 20 GSTs na espécie humana, estando tais enzimas presentes na maioria dos organismos vivos. A família das GSTs é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que podem conjugar-se com moléculas eletrofílicas, tornando-as menos tóxicas, já que catalisam o ataque nucleofílico pela glutathione sobre as mesmas (PERSSON et al., 1995). Entre as enzimas GSTs mais conhecidas estão as GSTM1, GSTT1 e GSTP1, todas polimórficas na população humana (ABDEL-RAHMAN et al., 1996). Como estas enzimas catalisam a conjugação da glutathione com xenobióticos, sua ausência poderia reduzir a capacidade de um organismo na eliminação de metabólitos reativos (CHENG et al., 1999).

A biossíntese da glutathione se dá intracelularmente pela ação combinada de duas enzimas: γ glutamil cisteína sintetase e glutathione sintetase. A primeira enzima é a que regula a síntese, sendo a cisteína o aminoácido limitante da

intensidade da síntese. Várias pesquisas demonstraram uma correlação positiva entre as concentrações de GSH em vários órgãos e a produção de anticorpos (IgM) pelas células do baço, em roedores (BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989; DIAS, 2004; BOUNOUS; GOLD, 1991; SGARBIERI et al., 2000).

Quantidades mínimas de cisteína são encontradas em alimentos como na clara de ovo crua, leite e carnes, porém, em quantidade insuficiente para sua utilização como substrato na síntese de glutathione, que exerce um papel central na proteção contra os efeitos danosos de bactérias, vírus, poluentes e radicais livres. É essencial na manutenção dos grupos tióis das proteínas e outros componentes. Está envolvida no transporte de aminoácidos e participa da iniciação e progressão de células de defesa do sistema imune. Sem a glutathione antioxidantes importantes como as vitaminas C e E não poderiam desempenhar suas funções biológicas. Além de interagir com várias drogas, participa também como cofator das enzimas formaldeído desidrogenase, maleilactoacetato isomerase, glioxalase, prostaglandina endoperoxidase isomerase e outras enzimas similares (MEISTER, 1991; BOUNOUS, 1997; ANDERSON, 1998).

A diminuição dos níveis de glutathione está associada com a diminuição da resposta imune. A glutathione intracelular está diretamente relacionada à habilidade dos linfócitos responderem a estímulos antigênicos em animais. A resposta imune humoral, envolvida na produção de anticorpos, requer rápida síntese protéica que, por sua vez, requer uma adequada ingestão dietética de aminoácidos essenciais encontrados em proteínas como as do soro de leite (BOUNOUS; GOLD, 1991).

A glutathione tem participação importante em vários estados patológicos como agente imunoestimulante, anti-inflamatório, desintoxicante de antirradicais livres (RUAN et al., 1997; LI et al., 2000; PASTORE et al., 2003).

- **Efeito hipocolesterolêmico**

Várias pesquisas avaliaram o efeito positivo das proteínas de soro na redução dos níveis de triglicérides e colesterol sanguíneo e/ou hepático. Os componentes bioativos que o soro contém podem proteger o coração contra

doenças. Por exemplo, peptídios derivados do soro podem também proteger o desenvolvimento da hipertensão, inibir agregação de plaquetas e baixar os níveis de colesterol sanguíneo. Os peptídios do soro mostraram inibição da atividade da enzima conversora da angiotensina (ACE), que converte o hormônio angiotensina I em angiotensina II a qual promove a vasoconstrição com conseqüente aumento da pressão sanguínea. Peptídios oriundos de algumas proteínas (α -lactalbumina e β -lactoglobulina) do soro são capazes de inibir a ACE (FITZGERALD; MEISEL, 2000; PIHLANTO-LEPPALA et al., 2000). Em estudo efetuado com humanos verificou-se que a ingestão, por 6 semanas, de um isolado protéico de soro hidrolisado contendo peptídios bioativos reduziu a pressão sanguínea em indivíduos hipertensos (PINS; KEENAN, 2004).

Algumas proteínas de soro podem também afetar a coagulação sangüínea. Estudos “in vitro” e “in vivo” sugerem que peptídios derivados do glicomacropéptido (GMP) e da lactoferrina podem inibir a agregação de plaquetas e a trombose (RUTHERFURD; GILL, 2000). Além disso, as proteínas de soro podem reduzir os níveis de colesterol ou apresentar um efeito favorável nos níveis dos lipídios sanguíneos (KAWASE; HASHIMATO; HOSODA, 2000; WALZERM, DILLARD, GERMAN, 2002).

Nagaoka, Kanamane e Kuzuia (1991) estudaram os efeitos das proteínas de soro e da caseína nos níveis séricos e hepáticos de lipídios em ratos, verificando maior efeito hipocolesterolêmico com as proteínas de soro do que com a caseína. A redução do colesterol hepático promovida por proteínas de soro foi atribuída, principalmente, à diminuição do LDL-colesterol. Em outro experimento, utilizando as mesmas fontes protéicas, acrescentadas de 1% de colesterol, os mesmos autores encontraram concentrações de colesterol sérico totais, significativamente menores, no grupo alimentado com proteína de soro lácteo (NAGAOKA et al., 1992).

Encontrou-se também efeito positivo na redução do colesterol sanguíneo em ratos machos da linhagem Wistar, semelhante ao efeito verificado com a proteína de soja, contrários à caseína que tende a aumentar a colesterolemia sangüínea e a lipídemia hepática (JACOBUCCI, 1999; JACOBUCCI et al., 2001).

- **Doenças crônico-degenerativas e longevidade**

O aumento na incidência de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e outras, no Brasil e no mundo, está associada às modificações ocorridas no padrão alimentar e no estilo de vida da população. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que estas doenças são responsáveis por 70-80% da mortalidade nos países desenvolvidos e 40% naqueles em desenvolvimento. As principais causas de morte no mundo, segundo a OMS, são doenças que poderiam ser prevenidas ou controladas por meio de modificação nos padrões alimentares. Estes dados contribuíram para o rápido progresso científico e industrial ocorrido nas últimas décadas (SALGADO, 2000).

As recentes descobertas nas áreas da bioquímica nutricional e biomédica contribuíram para desvendar as complexas relações existentes entre a nutrição e a incidência de várias doenças, indicando que proteínas contidas nos alimentos e peptídeos delas derivados podem desempenhar funções importantes na prevenção ou no controle de algumas condições patológicas. Alguns dos agentes funcionais derivados destes nutrientes poderiam ser importantes na melhoria da saúde, na promoção do bem estar e no aumento da longevidade (SGARBIERI et al., 2000).

No decorrer dos anos, inúmeros estudos demonstraram que o aumento do consumo de gordura na dieta e o aumento de doenças cardiovasculares, estão ligados a vários fatores como idade, características genéticas, estilo de vida sedentário e consumo de álcool (GROZIAK; MILLER, 2000).

O leite é composto por mais de 12 tipos diferentes de gordura incluindo esfingolípídios, esteróis livres, colesterol e ácido oléico. Um estudo com um grupo de 20 pessoas adultas saudáveis do sexo masculino procurou verificar se a suplementação do leite fermentado com adição de concentrado protéico de soro poderia afetar a pressão sangüínea e os lipídios séricos (KAWASE; HASHIMOTO; HOSODA, 2000). O leite continha *Lactobacillus casei* e *Streptococcus thermophilus*. Durante oito semanas, os voluntários consumiram pela manhã e a noite 200mL de leite fermentado com concentrado protéico de soro, e o grupo controle recebeu um placebo, que consistia em produto de leite não-fermentado

também adicionado de concentrado protéico de soro. Após oito semanas o primeiro grupo mostrou um aumento nos níveis de HDL e diminuição dos triacilgliceróis e da pressão sangüínea, em relação ao grupo controle. Embora os níveis de colesterol total e LDL-colesterol fossem mais baixos no grupo que recebeu leite fermentado, essa diferença não foi estatisticamente significativa (MARSHALL, 2004).

- **Atividade anticâncer**

O câncer é uma doença complexa cuja indução e desenvolvimento dependem de inúmeros fatores. É a segunda causa de morte nos Estados Unidos (22,9%) (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). O câncer de cólon é o terceiro mais comum em homens e mulheres, enquanto que o de mama é o segundo mais comum entre as mulheres. Observou-se também que o percentual de mortes em ambos os casos foi menor na população branca (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2000).

O consumo de derivados de leite pode interferir na ocorrência de muitos tipos de câncer, principalmente os de cólon e mama. Estudos com animais e culturas de tecidos (SLATTERY; NEUHAUSEN; HOFFMAN, 2004), e outros com humanos também encontraram uma relação inversa entre consumo de produtos de laticínios e a incidência de doenças de cólon. O aumento da ingestão de produtos lácteos com baixo teor de gordura por pacientes com histórico de desenvolvimento de pólipos de cólon, promoveu redução significativa nas alterações celulares pré-neoplásicas no cólon intestinal (HOLT, 1999; SATIA-ABOUT; GALANKO; MARTIN, 2004).

Várias pesquisas foram desenvolvidas nos últimos anos, tanto em modelos animais como em culturas de células, evidenciando que o concentrado protéico de soro exerce efeito anticarcinogênico. McIntosh e Le Leu (2001) compararam a eficiência de dietas contendo 15% de WPC, 15% de proteína de soja e dois outros tratamentos 15% soja + 5% lactoferrina ou 15% soja + 5% β -lactoglobulina. Os pesquisadores observaram que a suplementação da soja com 5% lactoferrina ou

5% β -lactoglobulina resultou em inibição da formação de lesões pré-cancerígenas, tão eficientemente quanto o WPC, evidenciando a importância dessas duas proteínas do soro na inibição do processo de carcinogênese.

O efeito protéico observado poderia ter ocorrido via aumento nas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) nos tecidos, podendo exercer efeito inibidor de tumores menores, via estimulação da imunidade. Sabe-se que a produção de radicais de oxigênio é um passo crítico na carcinogênese e, assim, sua eliminação é importante para inibir a doença (BOUNOUS, 2000). Diversos pesquisadores relacionaram a ativação da glutathiona-S-transferase (GST) em tecidos de animais com a prevenção de vários tipos de câncer (DIAS et al., 2006; KENT; HARPER; BOMSER, 2003).

As GSTs constituem um grupo de enzimas que apresentam especificidades comuns em relação ao substrato aceptor eletrofílico. Uma característica da GST é a elevada especificidade pela glutathiona reduzida (GSH); depois de combinada, apresenta especificidade maior para um segundo substrato. A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento SH, presente na cisteína (KENT; HARPER; BOMSER, 2003).

As duas teorias mais citadas a respeito da origem do câncer levam em conta a função protetora exercida pela glutathiona, agindo como antioxidante e desintoxicante. Encontrou-se forte correlação entre os mecanismos associados ao envelhecimento e o aparecimento do câncer uma vez que a incidência da doença em seres humanos e em animais aumenta, consideravelmente, com a idade. Além disso, as teorias do envelhecimento baseiam-se na existência de um acúmulo de lesões, tal é a teoria de radicais livres e outras que explicam a origem de alguns tumores. Outros atribuem o aumento na incidência de câncer associado à idade ao maior tempo de exposição aos agentes promotores da doença ao longo do tempo (BOUNOUS, 1997).

Estudos de indução de câncer de cólon em animais demonstraram menor incidência de criptas aberrantes e tumores em animais alimentados com proteínas do soro (SEKINE; WATANABE; NAKAMURA, 1997; HAKKAK et al., 2000; DIAS, 2004). Pesquisas na Austrália demonstram também a diminuição dos níveis de

criptas aberrantes, lesões pré-cancerígenas no cólon proximal de ratos alimentados com concentrado protéico de soro e tratados com carcinógenos químicos (BELOBRAJDIC; McINTOSH; OWENS, 2003). Estudos “in vitro” efetuados com isolado protéico de soro encontraram efeito positivo no aumento da efetividade das drogas anticancer (TSAI; CHANG; CHEN, 2000).

Yoo, Watanabe e Watanabe (1998) demonstraram que a lactoferrina tem habilidade de inibir metástases de tumores primários em camundongos com câncer. A albumina sérica bovina (10-15% do total de proteínas do soro) inibiu o crescimento de células de câncer de mama humano, em estudos “in vitro”.

Com relação às proteínas do soro, houve grande foco de atenção ao efeito inibidor do câncer exercido pela lactoferrina e lactoferricina. Resultados de ensaios “in vivo” com carcinogênese química demonstraram efeito protetor da lactoferrina bovina (administração oral no estágio de pós-iniciação do câncer) na inibição de câncer de cólon, esôfago, pulmão e bexiga (TSUDA; SEKINE; FUJITA, 2002). Outro estudo “in vitro” verificou que a lactoferrina exerceu efeito citotóxico contra três linhagens de células tumorais (ELIASSEN; BERGE; SVEINBJORNSSON, 2002)

Poucos ensaios clínicos envolvendo efeitos de proteínas de soro no câncer foram conduzidos. Sabe-se que as concentrações de GSH são altas em células tumorais conferindo-lhes resistência a agentes quimioterápicos. Em 1995, um pequeno ensaio foi conduzido com cinco pacientes com metástases de carcinoma de mama, um com câncer de pâncreas e outro de fígado. Esses pacientes receberam 30g de concentrado protéico de soro de leite, por 6 meses. Em seis pacientes os níveis de GSH aumentaram inicialmente nos linfócitos, sugerindo altos níveis de GSH nos tumores. No final do estudo, dois pacientes apresentavam sinais de redução tumoral e os níveis de GSH dos linfócitos estavam normais. Dois pacientes apresentaram sinais de estabilização dos tumores sem, contudo, apresentarem níveis normais de glutathione. Três pacientes apresentaram progressão da doença e aumento de GSH nos linfócitos (KENNEDY et al., 1995).

A modulação nutricional da GSH, pelo uso de proteínas isoladas de soro de leite em AIDS e câncer, pode encontrar outras aplicações em situações onde o

estresse oxidativo e doenças do metabolismo de GSH estejam intimamente relacionados (BOUNOUS, 2000; MARSHALL, 2004).

Em um ensaio clínico recente, 20 pacientes com câncer em estágio 4 (bexiga, mama, próstata, neuroblastoma, ovário, estômago, cólon, mesotelioma, linfoma, pulmão e osteosarcoma), receberam uma combinação de 40g por dia de WPC, 50-100g por dia de um suplemento intravenoso contendo vários componentes imunoativos, 1-2g por dia de ácido ascórbico, um complexo vitamínico mineral, 500mg de *Andrographis paniculata* duas vezes ao dia e um extrato de soja por 6 meses. Após esse período 16 pacientes sobreviveram todos apresentando aumento de células NK e maiores níveis médios de hematócrito e hemoglobina. Todos pacientes apresentaram melhoria na qualidade de vida durante o estudo. Nenhuma comparação foi feita entre a terapia combinada e outras somente com proteína de soro (SEE; MASON; ROSHAN, 2002).

Atividade antiulcerogênica

O estilo de vida e sua influência nos hábitos alimentares aumentaram a exposição dos indivíduos a fatores agressivos à mucosa gástrica. A incidência da úlcera gástrica tem aumentado devido principalmente ao estresse, ingestão de bebidas alcoólicas, abuso de anti-inflamatórios e a presença de várias bactérias, sendo a *Helicobacter pylori*, a mais estudada (SILVA et al., 1997; BIGHETTI, 1999).

Como porta de entrada de diversos agentes no organismo, o estômago desenvolveu diversos mecanismos de proteção. Os mecanismos citoprotetores e os mecanismos de secreção ácida gástrica aumentam a resistência das células e limitam o acesso dos agentes agressores a elas. Para avaliar a participação de compostos sulfidrilicos na citoproteção gástrica, os animais experimentais são tratados previamente com N-etilmaleimida (NEM), composto que promove alquilação dos grupamentos sulfidrílo, presentes na mucosa gástrica, inativando-os (RASTOGI et al., 1998; BIGHETTI, 1999).

Outro mecanismo utilizado para avaliar a participação dos grupamentos sulfidrílo é possível com a utilização de inibidores da síntese da glutathiona. A sulfoximina de butionina (BSO) é um inibidor potente da enzima γ -glutamylcisteína-sintetase, que promove a síntese da glutathiona tendo-se demonstrado que o bloqueio desta enzima induz severos danos à mucosa gástrica (YAMAGUCHI et al., 1998; HULTBERG; ANDRESON; ISAKSSON, 1999), visto que a glutathiona tem uma função antioxidante importante na defesa da mucosa contra agentes ulcerogênicos (HIRAISHI et al., 1994; WAKULICH; TEPPERMAN 1997; YAMAGUCHI et al., 1998).

Das e Banerjee (1993) mostraram que a administração intraperitoneal de glutathiona em ratos antes da indução de úlcera por estresse promoveu uma maior proteção da mucosa gástrica, em ratos.

Rosaneli (2002) e Rosaneli e colaboradores (2004), pesquisaram a ação de um preparado de concentrado protéico de soro, produzido em planta piloto (BORGES et al., 2001), na inibição da ação ulcerogênica do etanol absoluto, da indometacina (anti-inflamatório não-esteroidal) e de fatores de estresse como imobilização e frio, além de estresse químico com reserpina.

Os resultados dessas pesquisas permitiram concluir que o WPC e seus hidrolisados enzimáticos, protegem a mucosa estomacal de ratos contra as agressões do etanol absoluto e da indometacina, inibindo as lesões ulcerativas numa faixa de 50 a 80%, em relação a um controle negativo (solução salina fisiológica). Comparou-se também com drogas específicas para controle de úlcera gástrica, como a cimetidina e a carbenoxolona, cuja inibição foi da ordem de 80 a 90%. Chegou-se ainda à conclusão, através de testes de bloqueios metabólicos com reagentes específicos, que as vias operantes no mecanismo de proteção parecem envolver substâncias sulfidríla como cisteína, glutathiona e provavelmente enzimas que dependem de grupos sulfidrílo em seu centro catalítico (ROSANELI, 2002; CASTRO et al., 2010).

As proteínas do leite exercem papel importante na potencialização dos mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal. A α -lactalbumina que se encontra em concentrações significativas no concentrado protéico de soro de leite,

exerceu efeito protetor contra úlcera induzida por indometacina (MATSUMOTO et al., 2001).

Outros pesquisadores verificaram que o soro de leite fermentado, adicionado de uma cepa particular de bifidobactéria, exerceu efeito antimicrobiano, combatendo a bactéria *Helicobacter pylori*, responsável pela infecção bacteriana na maioria das úlceras (MILK-POINT, 2000).

Pesquisas recentes permitiram concluir que uma das proteínas do soro ativa contra a úlcera gástrica é a α -lactalbumina e que a β -lactoglobulina não apresentou ação antiulcerogênica em ratos (MATSUMOTO et al., 2001; MEZZAROBÀ, 2004; MEZZAROBÀ et al., 2006).

1.3 Soja

Isolados e concentrados protéicos de soja são de alto valor nutricional. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Food and Drug Administration (FDA) adotaram o PDCAAS (“protein digestibility corrected amino acid scoring”) como método alternativo de avaliação da qualidade nutricional de proteínas, podendo ser utilizado em substituição ao PER (“protein efficiency ratio”) quando a aplicação desse método não for desejável. A qualidade da proteína é estimada efetuando-se comparação entre o teor de aminoácidos da proteína analisada e as recomendações da Food Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) para os aminoácidos essenciais, sendo os valores corrigidos pela digestibilidade. Alguns produtos protéicos de soja apresentam o PDCAAS igual ou próximo a 1 (HOPPE et al., 2008), similares às proteínas de origem animal (SCHAAFSMA, 2000; 2005).

O alto PDCAAS encontrado para a proteína de soja está de acordo com estudos de balanço de nitrogênio efetuados, provando que a proteína de soja é capaz de suprir as necessidades de aminoácidos, quando utilizada como única fonte de proteínas da dieta, nos níveis recomendados de ingestão (MARIOTTI et al., 1999; HOPPE et al., 2008). É uma proteína completa com alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada. Há várias pesquisas que associam a

ingestão de proteína de soja com benefícios a saúde e performance, incluindo redução de perfil de lipídios plasmáticos, diminuição da oxidação de LDL-colesterol e redução da pressão sanguínea (HOFFMAN; FALVO, 2004).

Há vários séculos a soja é utilizada na alimentação humana. Os epidemiologistas foram os primeiros a reconhecer a existência de associação entre ingestão de soja e efeitos benéficos à saúde. Observando populações com alta ingestão de soja, verificaram baixa incidência em alguns tipos de câncer, problemas cardíacos, alívio nos sintomas da menopausa e osteoporose em mulheres (HASLER, 2002). Os benefícios à saúde associados à proteína da soja são relacionados aos componentes fisiologicamente ativos que fazem parte da soja como os inibidores de proteases, fitosteróis, saponinas e isoflavonas (ANDERSON; WOLF, 1995; MESSINA, 1995; POTTER, 2000; SACKS et al., 2006).

A soja contém substâncias fisiologicamente ativas capazes de atuar como moduladores dos processos metabólicos, na melhoria das condições de saúde e do bem-estar e diminui o risco do surgimento das doenças degenerativas. A utilização biológica dos componentes da soja na dieta traduz-se em processos específicos no organismo, tais como prevenção de certas enfermidades e melhoria dos mecanismos de defesa, retardando o processo de envelhecimento, ajudando no controle físico e mental do indivíduo. A soja contém teores variáveis de componentes benéficos e essenciais à saúde como as proteínas, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados e minerais (NAGOURNEY, 1998; BOATRIGHT; LEI, 1999; BARNES, 2004).

As isoflavonas são fitoestrógenos, apresentando propriedades antioxidantes extensivamente pesquisadas pelo seu potencial em reduzir os riscos de problemas crônicos de saúde, como o câncer, doenças coronárias e osteoporose. Os benefícios observados com relação à saúde cardíaca são, possivelmente devido à redução das concentrações de LDL-colesterol (CROUSE et al., 1999), devido à resistência da oxidação da LDL-colesterol (TIKKANEN et al., 1998) e melhoria na elasticidade dos vasos sanguíneos (NESTEL et al., 1999).

As principais isoflavonas encontradas na soja e em seus derivados são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína. Entre os compostos de aglicona, a genisteína exerce a mais alta atividade anticâncer (KATZ, 1999). Do total das isoflavonas, dois terços são de glicosídeos conjugados de genisteína, sendo o restante composto por conjugados de daidzeína e pequenas quantidades de gliciteína. Nos produtos fermentados de soja, predominam não só a genisteína, mas também a daidzeína, devido à ação das glicosidases bacterianas (SETCHELL, 1998; SACKS et al., 2006).

- **Proteínas da soja**

A aplicação da soja em alimentos tradicionais é cada vez maior e, pela simples mesclagem em níveis adequados, o produto de soja reduz o custo e complementa os produtos tradicionais, devido às suas propriedades funcionais. As proteínas da soja auxiliam na formação e estabilidade das emulsões óleo-água. Elas são tensoativas, agrupam nas interfases óleo-água estabilizando as emulsões. Na absorção de gordura, as proteínas da soja permitem a sua retenção, reduzindo as perdas em diversas etapas do processamento e consumo e ajudam a manter as dimensões originais dos alimentos evitando seu encolhimento. Essas proteínas contêm regiões polares ao longo de suas moléculas o que facilita a absorção de água, mantendo-as no produto final, características estas importantes, por exemplo, em iogurte e análogos de carnes. A capacidade de melhorar a textura é talvez a propriedade mais importante das proteínas de soja, pois no iogurte, por exemplo, as suas propriedades geleificantes conferem melhor textura ao produto (ENDRES, 2001). As proteínas de soja podem atuar como aglutinantes, agentes retentores de água, dispersante ou suspensor, podendo contribuir na formação e estabilidade de emulsões (SOY INGREDIENTS, 1999).

Aproximadamente 80 a 90% das proteínas totais da soja são proteínas de reserva, precipitáveis em pH 4,5 a 5,5. São insolúveis em água em seu ponto isoelétrico, mas se dissolvem em água ou soluções salinas diluídas, em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico. Constitui em uma mistura de

macromoléculas de tamanhos, densidade de carga e estruturas diferentes, podendo ser separadas por ultracentrifugação em quatro frações, com velocidades de sedimentação equivalentes a 2, 7, 11 e 15S. As frações 7S e 11S perfazem 70% da proteína total da soja. O restante sedimenta com as frações 2S e 15S. A globulina 11S, também denominada glicinina representa cerca de um terço do total das proteínas da soja. A fração 15S apresenta peso molecular acima de meio milhão com base na velocidade de sedimentação (MESSINA, 1999).

O fracionamento dos componentes 2S e 7S revelou a existência de várias proteínas. A fração 2S é composta por vários inibidores de tripsina, citocromo C, alantoinase, mais duas globulinas isentas de atividade biológica. A fração 7S representa mais de um terço do total das proteínas de soja, sendo formada de pelo menos quatro proteínas importantes: beta-amilase, lectinas, lipoxigenase e globulina 7S (SACKS et al., 2006).

As lectinas correspondem a uma classe de glicoproteínas bioativas na soja, com capacidade de aglutinar as células vermelhas do sangue, sendo também conhecidas como hemaglutininas. Constituem outro grupo de proteínas de soja que podem ser tóxicas ao organismo quando não desnaturada termicamente (PUSZTAI et al., 1997; FRIEDMAN; BRANDON, 2001). Como apresentam grande afinidade por carboidratos, as lectinas da soja isoladas e purificadas encontram várias aplicações na medicina e na bioquímica, incluindo fracionamento de proteínas da medula óssea (NAGLER, MORECK; SLAVIN, 1999), tratamento de colite ulcerativa (MACMAHON et al., 1997), em reagente de diagnóstico de câncer de estômago (TERASHIMA et al., 1997) e para quantificar o *Bacillus anthracis* (KALIMIN; SHAKHALINA; KULJAKINA, 1993).

Embora as proteínas de soja sejam indicadas como alternativa às proteínas do leite na alimentação de crianças alérgicas, vários trabalhos encontraram também reações alérgicas nas fórmulas infantis com proteínas de soja (BURKS et al., 1991; FOUCARD; YMAN, 1999; HILL et al., 1999). O mecanismo de reação alérgica às proteínas da soja parece não ser idêntico ao que se observa com proteínas do leite, mediado pela imunoglobulina E (ZEIGER et al., 1999).

Quando a farinha de soja desengordurada, suspensa em uma solução a 20% de sacarose em pH 5,0, é centrifugada em um gradiente de sacarose, obtêm-se os corpúsculos protéicos na forma de “pellets” e um homogenado solúvel em pH 5,0, semelhante em composição protéica, às proteínas solúveis obtidas pela precipitação isoeletrica. A fração solúvel em pH 5,0 contém a fração 2S e porções da fração 7S. Os corpúsculos protéicos contêm elevada proporção da fração 7S, toda a fração 11S e pequena quantidade da fração 2S (SGARBIERI, 1996).

A fração 7S (β -conglícinina) é uma glicoproteína trimérica que apresenta PM entre 140-180kDa, consistindo de três subunidades. Sua estrutura quaternária é constituída de nove resíduos amino-terminais, possuindo nove polipeptídios na molécula. Essas subunidades são associadas através de ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Essa fração possui menor quantidade de cisteína, metionina, triptofano e treonina do que a globulina. As ligações cruzadas dissulfídicas são limitadas pela presença de apenas 2 a 3 grupos de cisteína por mol de proteína (ARRESE et al., 1991).

Dentre as proteínas alimentícias de origem vegetal, as da soja apresentam excelentes propriedades tecnológicas e elevado valor nutritivo (FRIEDMAN, 1996; FRIEDMAN; BRANDON, 2001), apesar de relativa deficiência em aminoácidos sulfurados, particularmente metionina. Para um melhor aproveitamento biológico os grãos ou derivados da soja devem ser tratados termicamente, afim de inativar os inibidores de tripsina e de quimotripsina (inibidores de Kunitz e Bowman Birk) que diminuem a digestibilidade das proteínas da dieta, eliminando maior quantidade de nitrogênio nas fezes, tanto de origem alimentar quanto de origem endógena. Em algumas espécies de animais experimentais a ingestão de soja não cozida pode causar hipertrofia e outros distúrbios da fisiologia do pâncreas (HOLM et al., 1992; LIENER, 1996).

- **Propriedades funcionais fisiológicas**

Efeito hipocolesteremiante

A Food and Drug Administration (FDA) recentemente aprovou um documento relacionando a ingestão de proteína da soja com a redução de riscos de doenças cardíacas, recomendando um consumo de 25g por dia de proteína de soja como parte integrante de uma dieta com baixo teor de gordura saturada na redução do colesterol sérico. De fato, a ingestão dessa quantidade pode reduzir a LDL-c acima de 8% em pacientes com alto nível de colesterol, enquanto que em indivíduos normais não se verificaram alterações. Alguns estudos atribuíram parte desse efeito hipocolesteremiante a duas proteínas: globulinas 11S e 7S. Contudo, vários estudos mostraram que as isoflavonas presentes na soja (genisteína, daidzeína e gliciteína) são as responsáveis pela diminuição do colesterol (DEWELL; HILLENBECK; HOLLENBECK, 2006). Instituições como o “American Heart Association” também evidenciaram efeitos da soja na diminuição dos riscos de doenças cardíacas (COSTA; SUMMA, 2000).

O efeito da soja sobre os níveis de colesterol sérico é o mais bem documentado do ponto de vista fisiológico. Uma análise de 38 estudos envolvendo 743 indivíduos indicou que o consumo de proteína de soja resultou em redução significativa do colesterol total (9,3%), do LDL-colesterol (12,9%) e dos triglicerídeos (10,5%), com um pequeno, mas significativo aumento (2,4%) na HDL-colesterol (ANDERSON, 1996; MESSINA; BARNES; SETCHELL, 1997). Análise de regressão linear indicou que o nível limiar de ingestão de soja no qual os efeitos sobre os lipídios do sangue se tornaram significativos foi de 25g. Nesses estudos as isoflavonas foram consideradas responsáveis pelo efeito redutor dos níveis de colesterol verificado (POTTER, 1998), embora não tenham se verificado os mesmos efeitos em dois outros estudos (NESTEL; YAMASHITA; SASAHARA, 1997; HODGSON et al., 1998). O mecanismo exato pelo qual a soja exerce seu efeito hipocolesterolêmico não foi completamente elucidado.

As isoflavonas apresentam propriedades antioxidantes e podem auxiliar na eliminação de radicais livres potencialmente danosos e prevenir a oxidação da LDL-colesterol, associada à formação de placas ateroscleróticas, as quais diminuem o diâmetro das arteriais. A redução ou prevenção da oxidação do colesterol pode diminuir o risco de doenças cardiovasculares (TRABER, 1997; NAGOURNEY, 1998; BIANCHI; ANTUNES, 1999; POLLONI; VASCONCELOS; LAJOLO, 2000).

Alguns mecanismos foram descritos pelos quais as isoflavonas da soja podem inibir o desenvolvimento da aterosclerose independente dos efeitos nas lipoproteínas, podendo incluir atividade antioxidante, antiproliferativa e efeitos antimigratórios nas células do músculo liso, efeitos na formação de trombos e na manutenção da reatividade vascular normal (ANTONY; CLARKSON; WILLIAMS, 1998). Acredita-se que o consumo de proteínas de soja aumente os níveis de genisteína circulante, os quais inibem a atividade da tirosina quinase, enzima associada com o desenvolvimento de placas de ateromas (JONES, 2002).

As isoflavonas exercem efeitos na saúde cardiovascular, possivelmente pela redução das concentrações de LDL (CROUSE et al., 1999), aumento da resistência na oxidação de LDL (TIKKANEN et al., 1998) e melhorando a elasticidade das paredes sanguíneas do vaso (NESTEL et al., 1999).

Atividade anticâncer

O papel da soja e de seus derivados como agente anticâncer vem sendo muito pesquisado. Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem um efeito preventivo do consumo de soja em alguns tipos de câncer, como mama e próstata. Embora haja muitas pesquisas, existem poucos ensaios de prevenção primária. Alguns estudos clínicos foram conduzidos para avaliar o papel dos componentes da soja na inibição ou na progressão do câncer pelo uso de biomarcadores tumorais (ZHOU, 2004).

Várias classes de anticarcinógenos foram identificadas na soja, incluindo os inibidores de proteases, fitosteróis, saponinas, ácidos fenólicos, ácido fítico e

isoflavonas. Destes, as isoflavonas merecem destaque porque os grãos de soja são as únicas fontes dietéticas significantes destes compostos (MESSINA; BARNES; SETCHELL, 1997).

Além dos efeitos à saúde mediados pelo teor de aminoácidos, a soja contém vários componentes semelhantes aos estrógenos chamados isoflavonóides em especial a genisteína e a daidzeína com propriedades antioxidantes estando envolvidos na regulação dos níveis de lipídios circulantes (VAN DER SCHOUW et al., 2000) e redução no risco de desenvolvimento de câncer (LAMARTINIERE, 2000; SACKS et al., 2006).

Várias pesquisas mostraram que as isoflavonas interrompem o crescimento de células cancerosas de bexiga em humanos e ratos, com evidências de que este componente preparava as células cancerosas para a sua autodestruição por apoptose (PSZEZOLA, 1999).

As isoflavonas ingeridas com a soja sofrem biotransformação pela microflora intestinal sendo absorvidas na circulação onde afetam os níveis endógenos de estrógenos. Esses fitoestrógenos e seus metabólitos exercem várias atividades hormonais e não hormonais que podem explicar os efeitos biológicos verificados com ingestão de dietas ricas em fitoestrógenos (SETCHELL, 1998).

As fibras presentes na soja apresentam propriedades funcionais e seu consumo habitual exerce efeito positivo na saúde. As insolúveis, dentre outros efeitos, aumentam o volume das fezes melhorando o funcionamento intestinal, podendo agir na diminuição do risco do câncer de cólon. A fibra solúvel pode diminuir os níveis de colesterol e ajudar na manutenção de níveis glicêmicos normais (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

Vários estudos investigaram o efeito da suplementação da soja em mulheres saudáveis, focando as isoflavonas e seu efeito semelhante aos estrógenos naturais, podendo se ligar aos receptores de estrógenos e competindo por eles, reduzindo assim os riscos de câncer de mama (WU et al., 1998) embora essa associação ainda não seja conclusiva.

Inúmeros trabalhos associam a baixa mortalidade por câncer verificada entre os japoneses à alta ingestão de compostos existentes nos produtos

derivados de soja, entre os quais o inibidor de proteases Bowman-Birk, uma proteína de PM de 8000Da, capaz de inibir a tripsina e a quimotripsina (MESSINA et al., 1994). Alguns inibidores de proteases são efetivos em prevenir e suprimir modificações induzidas por carcinógenos em ensaios “in vitro” e pesquisas desenvolvidas com animais. Embora outros dois componentes da soja (ácido fítico e β -sitosterol) tenham se mostrado efetivos na supressão da carcinogênese em animais, o Bowman-Birk foi o mais efetivo (KENNEDY et al., 1993a; KENNEDY, 1998), sendo capaz de prevenir completamente a carcinogênese de cólon (100% de supressão), de fígado (71%), no epitélio oral (86%) e no pulmão em 48% (KENNEDY, 1995).

A atividade anticarcinogênica do inibidor de Bowman-Birk foi muito estudada em vários ensaios “in vitro” e “in vivo”, em diferentes modelos animais (KENNEDY et al., 1993 b; CHANG; KENNEDY, 1993; KENNEDY, 1996). O efeito verificado ocorre por sua habilidade em reverter à fase de iniciação da patologia. Sabe-se que poucos agentes anticarcinogênicos são capazes de inativar as células iniciadas (KENNEDY, 1996).

A habilidade de reverter a iniciação foi observada, inicialmente, em estudos “in vitro”. Em estudos de carcinogênese desenvolvidos com animais, o Bowman-Birk reduziu as lesões pré-neoplásicas e o desenvolvimento de tumores em vários sistemas estudados (VON HOFER; NEWBERNE; KENNEDY, 1991). Foi efetivo mesmo quando ministrado três meses após a exposição ao agente carcinogênico, em ensaio com duração de seis meses, o que permitiu sugerir que o tratamento com o inibidor de Bowman-Birk apresentou alta toxicidade tanto nas lesões pré-neoplásicas quanto nos tumores (KENNEDY, 1996; KENNEDY et al., 1996).

Efeito nos sintomas da menopausa

Vários estudos encontraram efeitos positivos da suplementação da proteína de soja na manutenção da integridade mineral óssea (HO et al., 2003) e na redução da severidade dos sintomas da menopausa (MURKIES et al., 1995), representando uma alternativa para aliviar os fogachos (ondas de calor), um dos

sintomas indesejáveis da menopausa. Embora o tratamento convencional seja a terapia de reposição hormonal, estudos clínicos recentes indicam que esse tratamento pode aumentar a incidência de câncer de mama, ataques cardíacos e derrame. Algumas mulheres adotam terapias alternativas, com utilização de suplementos de soja contendo isoflavonas, conseguindo melhoria dos sintomas da menopausa (ZHOU et al., 2003; HUGHES et al., 2006).

A teoria de que a soja pode aliviar os sintomas da menopausa foi sugerida pela observação de que mulheres asiáticas relatavam níveis significativamente menores de fogachos e suores noturnos quando comparadas com mulheres ocidentais. Mais recentemente, a ingestão de 60g de IPS diariamente por três meses reduziu esses sintomas em 45% em 104 mulheres na pós-menopausa (ALBERTAZZI et al., 1998). Ainda que essas observações sejam animadoras, verificou-se um significativo efeito placebo nestes estudos, sendo prematuro sugerir que a soja possa ser um substituto para a terapia de reposição hormonal.

Estudos epidemiológicos observacionais efetuados no Japão (NAGATA et al., 2001) encontraram que a ingestão de soja promoveu efeito na redução dos fogachos. Vários ensaios clínicos foram conduzidos, com resultados similares aos encontrados anteriormente (ALBERTAZZI et al., 1999; SCAMBIA; MANGO; SIGNORILE, 2000; UPMALIS et al., 2000). Curiosamente, os mesmos efeitos não foram verificados com mulheres que se curaram de câncer de mama (NIKANDER et al., 2003).

Os efeitos da soja em outros sintomas da menopausa também foram investigados e os resultados foram revistos recentemente por Huntley e Ernst (2003). O primeiro trabalho citado revisou os resultados de 10 ensaios clínicos que verificaram os efeitos de vários produtos de soja nos sintomas da menopausa. Mesmo não se encontrando resultados conclusivos, verificou-se alguma evidência da eficácia de preparações de soja no alívio de sintomas de menopausa. Por outro lado também indicaram não haver nenhum perigo associado ao uso de produtos de soja por curto tempo. Conclusões similares foram verificadas por Messina e Hughes (2003), sendo que esses autores focaram uma associação entre a

ingestão de produtos de soja e a redução da intensidade e frequência dos sintomas, especialmente dos fogachos.

A soja também pode beneficiar a saúde dos ossos (ANDERSON; GARNER, 1997). Um estudo clínico envolvendo 66 mulheres pós-menopausa constatou que a ingestão diária de 40g de isolado protéico de soja (contendo 90mg de isoflavonas totais) aumentou significativamente tanto o conteúdo mineral como a densidade óssea na coluna lombar, após seis meses de utilização (ERDMAN; POTTER, 1997).

1.4 Proteínas do sangue bovino

O sangue é formado de uma fração celular ($\cong 35\%$) e de plasma ($\cong 65\%$) do volume total. Na fração celular predominam as hemáceas que contêm a hemoglobina, formada pela globina (fração protéica) e pelo radical heme, formado por núcleos tetrapirrólicos, cada um ligando com um átomo de ferro em sua estrutura central (PRATA, 2002; MOURE; RENDUELES; DIAZ, 2003; PRATA; SGARBIERI, 2005).

Dentre as proteínas do plasma destacam-se a soralbumina bovina (BSA), 66kDa representando 60% da massa total das proteínas do plasma sanguíneo e as globulinas (α , β e γ -globulinas). A fração α -globulina, por sua vez contém: a) orosomucóide, uma proteína ácida (pI = 2,7) contendo 40% de carboidratos na molécula e massa molecular 41 kDa; b) α 1-antitripsina, uma glicoproteína com 12% de carboidrato, massa molecular 54 kDa. É um inibidor de tripsina cuja concentração média (3g/L de plasma) varia em função do estado fisiológico; c) α 1-fetoproteína, 4,3% de carboidrato, massa molecular 70 kDa. É uma glicoproteína essencial para o desenvolvimento do embrião. A fração β -globulina tem como principal representante a transferrina, 6% de carboidrato, massa molecular 80 kDa, proteína importante no transporte de ferro no organismo. As γ -globulinas representam uma classe de glicoproteínas que contém as imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG). São anticorpos com função importante na defesa do organismo (SGARBIERI, 1996).

O plasma não coagulado contém ainda o fibrinogênio, proteína filamentosa formada de três cadeias polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$ e $B\gamma$) que se apresentam na forma de um dímero (massa molecular 340 kDa). O fibrinogênio é o precursor da fibrina, proteína responsável pela formação do coágulo no fenômeno da coagulação sangüínea (SGARBIERI, 1996).

Quando o sangue é coletado na presença de um agente coagulante o fibrinogênio se transforma em fibrina que forma o coágulo arrastando a fração celular do sangue. O coágulo é separado do soro sanguíneo por centrifugação. O soro sanguíneo contém todas as proteínas do plasma, exceto o fibrinogênio. As duas principais frações da proteína do soro de sangue bovino podem ser obtidas por precipitação com sulfato de amônio, seguida de centrifugação e diálise das frações para obtenção das frações albumina e globulina, parcialmente purificadas (DUARTE, 1997; PRATA; SGARBIERI, 2005).

A BSA apresenta um bom perfil de aminoácidos essenciais. Liga ácidos graxos livres, outros lipídios e compostos de flavor. A função primária da BSA foi associada com a propriedade de ligar lipídios, podendo desenvolver papel na mediação da oxidação lipídica (BEAULIEU; DUPONT; LEMIEUX, 2007). Do ponto de vista da composição aminoacídica, a fração albumina apresenta escore de aminoácidos essenciais (EAE) de 70%, sendo o triptofano o aminoácido mais limitante; a fração globulina apresenta EAE de 88% sendo a isoleucina o aminoácido mais limitante, enquanto que para as proteínas do soro integral o EAE foi de aproximadamente 91% (PRATA; SGARBIERI, 2005).

Além de sua importância para o sistema imune, a albumina de soro bovino funciona também no sangue como importante transportador de minerais, vitaminas, ácidos graxos e outras substâncias bioativas (PRATA; SGARBIERI, 2005).

1.5 Formação e funcionamento do sistema imunológico

O sistema imune é composto por órgãos, células especializadas e moléculas solúveis que tem a finalidade de reconhecer os elementos estranhos ao organismo e elaborar uma reação, ou resposta imune específica, dirigida a esses

antígenos, com a finalidade de eliminá-los do organismo e preservar à saúde (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007). Compreende uma complexa inter-relação entre células linfóides e mielóides, entre moléculas e células e entre células efetoras do sistema imune e sinais remotos do sistema não imune (WONG et al., 1997).

O sistema imune age na proteção do hospedeiro contra agentes infecciosos que existem no ambiente (bactérias, vírus, fungos e parasitas, dentre outros). A resposta imune é estimulada quando o indivíduo é exposto a um agente estranho. Há dois tipos de resposta imune: inata ou natural e adaptativa ou específica. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos, estando presente antes da exposição ao patógeno, não aumentando a atividade mediante tal exposição (CALDER; KEW, 2002). Os componentes mais conhecidos são os fagócitos poli e mononucleares, as células NK, o sistema complemento, e também todas as células processadoras de antígenos, entre as quais estão as células dendríticas, essenciais para o desenvolvimento da categoria de mecanismos de proteção anti-infecciosa, a imunidade específica ou adaptativa (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

A imunidade adquirida envolve a identificação de molécula (antígeno) ou patógeno como estranho ao hospedeiro por anticorpos (imunoglobulinas produzidos pelos linfócitos B) e por linfócitos T, após o primeiro contato com esses agentes estranhos. Desenvolve-se, então, o componente de memória imunológica e, se o mesmo antígeno é encontrado novamente, a resposta é maior e mais forte do que a resposta inicial (CALDER; KEW, 2002).

A imunidade específica possibilita identificar os elementos estranhos em contatos subsequentes, e distingui-los de componentes do próprio organismo ("self") ou não ("non-self") e, sequencialmente, ocorre uma reação rápida e específica como resposta protetora. Desta forma, é a resposta imune adaptativa que detém os atributos da memória e da especificidade na reação. Os linfócitos T e B são responsáveis pelo reconhecimento imune-específico dos patógenos e pelo desencadeamento das respostas imune adaptativas. Estas células são derivadas de células-tronco da medula óssea, entretanto, os linfócitos T sofrem um processo

de desenvolvimento no timo, enquanto os linfócitos B se desenvolvem na própria medula óssea (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

A resposta imune específica é classificada em humoral e celular, de acordo com os componentes do sistema imune que mediam a resposta. A humoral é mediada por moléculas no sangue que são responsáveis pelo reconhecimento específico e eliminação de antígenos. Há produção de anticorpos que podem ser transferidos a indivíduos não imunizados por meio de frações do sangue (plasma ou soro, por exemplo). A imunidade celular é mediada por células chamadas linfócitos T (ABBAS; LICHMAN; POBER, 1997).

Os principais constituintes celulares do sistema imune são os linfócitos, os fagócitos mononucleares e as células acessórias relacionadas. Os linfócitos são células imuno competentes capazes de reconhecer antígenos específicos. Eles são morfologicamente homogêneos, mas apresentam porções distintas que lhes conferem funções diferentes sendo fenotipicamente diferentes. Os linfócitos B são células que produzem anticorpos e mediam a resposta imune humoral. Alguns linfócitos T expressam um marcador de superfície CD4 e agem como células “helper”, estimulando a produção de linfócitos B e ativando macrófagos para destruir microorganismos fagocitados. Outros linfócitos T expressam marcador CD8 funcionando como células citotóxicas que vão destruir antígenos estranhos. As células NK “natural killer” não são linfócitos B nem T, sendo capazes de promover lise em células tumorais e infectadas por vírus. Os fagócitos mononucleares são essenciais para a defesa do organismo na imunidade específica estando também envolvidos nas fases de reconhecimento, ativação e ação da resposta imune específica. As células dendríticas são células acessórias envolvidas na iniciação da resposta dos linfócitos T a antígenos protéicos (ABBAS; LICHMAN; POBER, 1997).

A comunicação dentro do sistema imune adquirido e entre os sistemas inato e adquirido é realizado através de contato célula a célula envolvendo moléculas de adesão e por mensageiros químicos produzidos. As citocinas são as principais mensageiras químicas podendo agir na regulação da atividade tanto das células que as produzem quanto de outras células. Cada citocina pode apresentar

múltiplas atividades em diferentes células. Elas agem se ligando a receptores específicos na superfície celular e por meio de sinais metabólicos induzem alterações no crescimento, desenvolvimento ou atividade da célula alvo (CALDER; KEW, 2002).

A distinção entre componentes específicos e não específicos da resposta imune é arbitrária, tendo em vista que a resposta a um agente estranho envolve o trabalho orquestrado desses componentes, que agem em conjunto protegendo o organismo (CROSS; GILL, 2000). Quando o estímulo imunológico ocorre, a resposta inata, incluindo componente inflamatório responde inicialmente, agindo diretamente para eliminá-lo por atividade do complemento, fagocitose e outros. As citocinas (por exemplo, fator de necrose tumoral – TNF- α , interleucina – IL-1 e IL-6) produzidas pelas células envolvidas na resposta inata, especialmente monócitos e macrófagos vão regular essa resposta e também agir sistematicamente no fígado (para promover a síntese protéica em fase aguda), no músculo esquelético, tecido adiposo (proteólise e lipólise, respectivamente) e no cérebro para reduzir apetite e induzir a febre. Estas citocinas vão também interagir com os linfócitos T (BECK et al., 1997).

Células que apresentam antígenos incluindo, monócitos e macrófagos ativados, vão apresentar antígeno para linfócito T e, então, a resposta imune adquirida vai ser desencadeada, ocorrendo a resposta mediada por célula. Os linfócitos T vão produzir citocinas que vão regular a atividade das células envolvidas na resposta inata (monócitos, macrófagos, células NK), promover a proliferação de linfócitos B e T e a produção de anticorpos pelos linfócitos B. Em virtude da integração entre resposta imune inata e resposta adquirida a fonte de antígeno pode ser eliminada, permanecendo um componente de memória imunológica (CALDER; KEW, 2002).

Na espécie humana, o sistema imunológico se forma a partir de células tronco embrionárias. A partir de 1960 tornou-se conhecido que células tronco originam duas amplas linhagens de linfócitos, bem como as demais células sangüíneas. Uma linhagem consiste das células B, que se desenvolvem na medula óssea e tem como principal função produzir anticorpos, que se ligam às

proteínas que são estranhas ao organismo e as marcam para serem atacadas por outras células do sistema imune. Elas atuam contra patógenos extracelulares como, por exemplo, toxinas produzidas por bactérias. Outra linhagem de células são as células T, que se formam na medula e se transformam no timo. As células atuam contra patógenos intracelulares como vírus além de parasitas intracelulares como os da tuberculose. As células T também secretam moléculas protéicas conhecidas como linfocinas, que orientam a atividade das células B, de outras células T e de outras partes do sistema imune (WEISSMAN; COOPER, 1993).

Uma vez formadas, as células B e T migram para o baço, para os nódulos linfáticos e para os tecidos linfóides intestinais. Nesses tecidos as células do sistema imune poderão encontrar antígenos que são moléculas invasoras de origem microbiana ou viral, quando irão produzir anticorpos específicos contra esses agentes invasores. Os linfócitos circulam continuamente por todo corpo através do sistema vascular linfático, por onde chegam aos órgãos linfóides exercendo sua função de patrulhas contra antígenos invasores (WEISSMAN; COOPER, 1993).

Na medula óssea algumas células tronco se modificam, passando diretamente ao que se convencionou chamar de células NK, "Natural Killer". A maioria das células tronco que penetram na medula se transformam em células pró-B, após receberem sinais químicos de células especiais (células estromais). As células pró-B continuam recebendo esses sinais químicos, transformando-se em células pré-B, já com alguma capacidade de formar anticorpos. Por último, formam-se as células B e estas se transformam em células plasma, quando adquirem completa capacitação para secretarem anticorpos, quando solicitadas pela presença de antígenos específicos (NOSSAL, 1993).

As transformações para a maturação das células T são mais complexas que as das células B. As células T são produzidas no timo a partir de células tronco migradas da medula óssea. As células em maturação atravessam vários estágios que podem ser distinguidos por proteínas que se expressam em sua superfície. Moléculas do chamado complexo de histocompatibilidade principal (MHC) retêm fragmentos de proteínas antigênicas para serem apresentadas às

células T. Os complexos MHC são divididos em dois tipos: classe I e classe II. Células em transformação que possuam receptores em sua superfície para se ligar ao complexo MHC (classe I) se transformarão em células T “helper” enquanto que as células contendo receptores superficiais para o complexo MHC (classe II) se transformarão em células T “killer”. Por último, as células que não se ligam a nenhuma das classes de MHC ou que se ligam a antígenos produzidos pelo próprio corpo irão morrer (WEISSMAN; COOPER, 1993). Os vários tipos de células T poderão ser reconhecidos por marcadores de superfície que reagem com antígenos específicos (JANEWAY JR., 1993).

Pesquisas desenvolvidas por Bounous e colaboradores (BOUNOUS; LETORNEAU; KONGSHAVN, 1983; BOUNOUS; KONGSHAVN, 1985; BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989) mostraram diferenças na capacidade imunomodulatória de proteínas alimentícias, sendo a lactalbumina a de maior poder imunoestimulante, dentre várias proteínas testadas. Ficou também demonstrado (BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989) o grande poder da lactalbumina em promover a síntese de glutathione e que o bloqueio da síntese de glutathione através do inibidor específico BSO (butationina sulfoximina) inibe ao mesmo tempo, a síntese de glutathione e a produção de anticorpos (IgM) no baço; quando desafiado por eritrócitos de carneiro (SRBC).

O sistema imune desenvolveu no sistema gastrointestinal (SGI) duas fontes de defesa muito importantes, segundo Brandtzaieg (1998): a) de exclusão imune desempenhado por anticorpos secretórios, particularmente da classe da imunoglobulina A (IgA) que inibe a colonização de microorganismos patogênicos e a penetração de antígenos danosos que chegam ao lume intestinal; b) mecanismos regulatórios para evitar reações locais ou periféricas que possam promover hipersensibilidade contra substâncias inócuas que bombardeiam a superfície da mucosa. Esse último fenômeno é conhecido como tolerância oral quando é induzido no sistema GI contra antígenos da dieta ou até mesmo contra agentes perigosos da microbiota intestinal. Esse sistema associado ao sistema linfóide intestinal (GALT, em inglês) é crucial para a indução da resposta imune a agentes infecciosos encontrados na superfície da mucosa.

Inúmeras pesquisas feitas “in vivo” e “in vitro” investigaram o potencial do leite bovino em exercer efeito na saúde humana via modulação do sistema imune. Os experimentos “in vivo” geralmente são feitos com roedores, envolvendo um componente investigado colocado na ração, sendo acompanhado de monitoramento longitudinal das alterações da resposta imune (BOUNOUS et al., 1983; WONG; WATSON, 1995). As pesquisas “in vitro” envolvem a inclusão de componentes testados em meio contendo células alvo (usualmente leucócitos obtidos de culturas de linhagens de células imune) seguida da medida dos efeitos das alterações dos tratamentos na função dessas células (OTANI et al., 1995). Os resultados destes testes foram muito variados em decorrência das condições de experimentação, manipulação e variáveis experimentais. Por outro lado, mesmo que os resultados de um estudo “in vivo” ofereçam fortes evidências de que um componente testado irá modular a função imune quando usado na dieta, essa abordagem pode ser afetada pelos mecanismos de controle da resposta imune. Existe ainda um longo caminho a percorrer no sentido de identificar e esclarecer de quais modos um dado componente alimentar pode modular a função imune quando incluído na dieta (CROSS; GILL, 2000).

1.6 Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. 494 p.

ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R. A.; ANWAR, W. A.; AU, W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 229-233, 1996.

AÎT-OUKHATAR, N.; BOUHALLAB, S.; ARHAN, P.; MAUBOIS, J. L.; DROSDOWSKY, M.; BOUGLÉ, D. L. Iron tissue storage and hemoglobin levels of deficient rats repleted with iron bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of β -casein. **Journal of Agriculture and Food Chemists**, Washington, v. 47, n. 7, p. 2786-2790, 1999.

AÎT-OUKHATAR, N.; BOUHALLAB, S.; BUREAU, F.; ARHAN, P.; MAUBOIS, J. L.; BOUGLÉ, D. L. In vitro digestion of caseinophosphopeptide-iron complex. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, n. 1, p. 125-129, 2000.

ALBERTAZZI, P.; PANSINI, F.; BOTTAZI, M.; BONACCORSI, G.; DE ALOYSIO, D.; MORTON, M. S. Dietary soy supplementation and phytoestrogen levels. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 94, n. 2, p. 229-231, 1999.

ALBERTAZZI, P.; PANSINI, F.; ZANOTTI, L.; FORINI, E.; ALOYSIO, D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 91, n. 1, p. 6-11, 1998.

ANDERSON J. J. B.; GARNER S. C. The effects of phytoestrogens on bone. **Nutrition Research**, New York, v. 17, n. 10, p. 1617-1632, 1997.

ANDERSON, J. W. Phytoestrogen effects in humans relative to risk for cardiovascular disease, breast cancer, osteoporosis, and menopausal symptoms. In Pavlik E. J. (Ed.). **Estrogens, progestins, and their antagonists**. Boston: Birkhauses, 1996. p. 51-71.

ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interaction**, Limerick, v. 111-112, n. 1, p. 1-14, 1998.

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Composition changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 581S-588S, 1995.

ANTONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; WILLIAMS, J. K. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p. 1390S-1393S, 1998.

ARIYOSH, H. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 139-144, 1993.

ARRESE, E. L.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Eletrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein

isolates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 39, n. 6, p. 1029-1032, 1991.

AUGUSTIN, O. M.; MUNÓZ, E. M. V. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 21, (Supl. 2), p. 1-14, mar. 2006.

BABBITT, P. C. Reengineering the glutathione S transferase scaffold: a rational design strategy pays off. **Proceeding National Academy Sciences**, Washington, DC, v. 97, n. 19, p. 10293-10300, 2000.

BARNES, S. Soy isoflavones: phytoestrogens and what else? **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, n. 5, p. 1225S-1228S, 2004.

BARUCHEL, S.; VIAU, G.; OLIVIER, R.; BOUNOUS, G.; WAINBERG, M. A.; Nutraceutical modulation of glutathione with a humanized native milk serum protein isolate, mmunocalTM: application in AIDS and cancer. In: MONTAGNER, L.;

OLIVIER, R.; PASQUIER, C. **Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 447-462.

BEAULIEU, J.; DUPONT, C.; LEMIEUX, P. Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. **Therapy**, London, v. 3, n. 1, p. 69-78, 2006.

BECK, F. W.; PRASAD, A. S.; KAPLAN, J. FITZGERALD, J. T. BREWER, G. J. Changes in cytokines production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 272, n. 6, p. E1002-E1007, 1997.

BELOBRAJDIC, D. P.; McINTOSH, G. H.; OWENS, J. A. Whey proteins protect more than red meat against azoxymethane induced ACF in Wistar rats. **Cancer Letters**, Limerick, v. 198, n. 1, p. 43-51, 2003.

BIANCHI; M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIGHETTI, A. E. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto e da Cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas, SP. UNICAMP, 1999. 100p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 90, n. 2-3, p. 157-177, 2001.

BOATRRIGHT, W. L.; LEI, Q. Compounds contributing to the beany odor of aqueous solutions of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 4, p. 667-670, 1999.

BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M. P.; MAUBOIS, J. L.; BEAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate post-prandial protein secretion. **Proceedings of the National Academic of Science**, Washington DC, v. 94, n. 26, p. 14930-14935, 1997.

BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; JACOBUCCHI, H. B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de proteína de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal for Food Technology**, Campinas, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

BOS, C.; GAUDICHON, C.; TOMÉ, D. Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. **Journal of the American College of Nutrition**, Washington, DC, v. 19, n. 2, p. 191S-205S, 2000.

BOSSELAERS, I. E. M.; CAESSENS, P. W. J. R.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; ALINK, G. M. Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO or MNNG induced SCEs in V79 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 905-909, 1994.

BOUHALLAB, S.; LÉONIL, J.; MAUBOIS, J. L. β -casein phosphopeptide (1-25) - iron complex: action of alcalase and acid fosfatase. **Le Lait**, Lyon, v. 71, p. 435-443, 1991.

BOUNOUS, G. The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate. **Immunotec Research**, Scottsdale, 1997. p. 1-16.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Ulrich, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, 2000.

BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 16, n. 3, p. 204-209, 1993.

BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 12, n. 3, p. 154-161, 1989.

BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. Whey protein in cancer prevention. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 91-94, 1991.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey protein: role of glutathione. **Clinical Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P. A. L. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, n. 11, p. 1403-1408, 1985.

BOUNOUS, G.; LETORNEAU, L.; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 113, n. 7, p. 1415-1421, 1983.

BRANDTZAIEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutrition Review**, Washington, v. 56, n. 1, p. S5-S18, 1998.

BRINK, W. The faces of whey. **Life Extension Report**, Life Extension Foundation, Scottsdale, p. 43-48, 2002.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, Life Extension Foundation, Scottsdale, v. 1, n. 1, p. 21-28, 1996.

BURKS, A. W. A.; WILLIAMS, L. W.; HELM, R. M. THRESHER, W.; BROOKS, J.; SAMPSON, H. A. Identification of soy protein allergens in patients with atopic dermatitis and positive soy challenges: determination of change in allergenicity after heating or enzyme digestions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 289, p. 295-307, 1991.

CALDER, P. C.; KEW, E. The immune system: a target for functional foods? **British Journal of Nutrition**, London, v. 88 (suppl. 2), p. S165-S176, 2002.

CASTRO, G. A.; CARVALHO, J. E.; TINTI, S. V.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V. C. Anti-ulcerogenic effect of a whey protein isolate and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 13, n. 1, p. 83-90, 2010.

CHANG, J. D.; KENNEDY, A. R. Suppression of *c-myc* by anticarcinogenic protease inhibitors. In: TROLL, W.; KENNEDY, A. R. (Eds.). **Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents**. New York: Plenum Press, 1993. p. 265-280.

CHENG, L.; STURGIS, E. M.; EICHER, S. A.; CHAR, D.; SPITZ, M. R.; WEI, Q. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 84, n. 3, p. 220-224, 1999.

CORTES, J. F. F.; FERNANDES, S. L.; NOGUEIRA-MADURO, I. P. N.; BASILE-FILHO, A.; SUEN, V. M. M.; SANTOS, J. E.; VANNUCHI, H.; MARCHINI, J. S. Terapia nutricional no paciente criticamente enfermo. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 394-398, 2003.

COSTA, R. C.; SUMMA, M. A. Soy protein in the management of hyperlipidemia. **American Pharmacotherapy**, Washington, v. 34, n. 7-8, p. 931-935, 2000.

COTGREAVE, I. A.; GERDES, R. G. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? **Biochemistry, Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 242, n. 1, p. 1-9, 1998.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**: 3. ed. Barueri: Manole.. 2009. 1020p.

CROSS, M. L.; GILL, H. S. Immunomodulatory properties of milk. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84 (suppl. 1), p. S81-S89, 2000.

CROUSE, J. R.; MORGAN, T.; TERRY, J. G.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, G. L. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoprotein. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 159, n. 17, p. 2070-2076, 1999.

DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENA, C.; GACHON, P.; FAUQUANT, J.; CALLIER, P. The digestion rate is an independent regulating factor of post prandial protein retention. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 280, n. 2, p. 340E-E348, 2001.

DAS, D.; BANERJEE, R. K. Effects of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 115-125, 1993.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.

DEVINE, A.; PRINCE, R. L.; BELL, R. Nutritional effect of calcium supplementation by skim milk powder or calcium tablets on total nutrient intake in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 64, n. 5, p. 731-737, 1996.

DEWELL, A.; HILLENBECK, P. L.; HOLLENBECK, C. B. A critical evaluation of the role of soy protein and isoflavone supplementation in the control of plasma cholesterol concentrations. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 91, n. 3, p. 772-780, 2006.

DIAS, N. F. G. P. **Propriedades imuno-estimulatórias e antitumoral de concentrados protéicos de soro de leite bovino, de caseína e de um isolado protéico de soja**. Campinas, SP: UNICAMP, 2004, p. 149. Dissertação (Doutorado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2004.

DIAS, N. F. G. P.; SGARBIERI, V. C.; JACOBUCCHI, H. B.; RANGEL, H. A.; TANIKAWA, C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in mouse. **Le Lait**, Lyon, v. 86, n. 3, p. 213-226, 2006.

DUARTE, R. M. T. **Obtenção de frações protéicas do sangue bovino: composição, valor nutritivo e propriedades funcionais.** Campinas, SP: UNICAMP, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 1997.

DYBING, E.; DOE, J.; GROTEN, J.; KLEINER, J.; O'BRIEN, J.; RENWICK, A. G.; SCHLATTER, J.; STEINBERG, P.; TRITSCHER, A.; WLAKER, R.; YOUNES, M. Hazard characterization of chemicals in food and diet. **Food Chemical and Toxicology**, London, v. 40, n. 1-2, p. 237-282, 2002.

EARLY, R. **The technology of dairy products.** 2. ed. Blackie Academic e Professional, 1998.

ELIASSEN, L. T.; BERGE, G.; SVEINBJORNSSON, B. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. **Anticancer Research**, Athens, v. 22, n. 5, p. 2703-2710, 2002.

ELLIS, L.; MASTRO, A. M.; PICCIANO, M. F. Milk-borne prolactin and neonatal development. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, New York, v. 1. n. 3, p. 259-269, 1996.

EL-NAGGER, A. K.; VAN EPPS, D. E.; WILLIAN JR.;R, C. Human β and T lymphocyte locomotion in response to casein, C5a, f-met-Leu-phe. **Cellular Immunology**, New York, v. 56, n. 2, p. 365-373, 1980.

EL-SALAM, M. H. ABD; EL-SHIBINY, S.; SALEM, A. Factors affecting the functional properties of whey protein products: a review. **Food Reviews International**, London, v. 25, n. 3, p. 251-270, 2009.

ENDRES, J. G. **Soy protein products:** characteristics, nutritional aspects, and utilization. Champaign: American Oil Chemists' Society - AOCS, 2001. 53 p.

ERDMAN, J. W.; POTTER, S. M. Soy and bone health. **The Soy Connection**, Chesterfield, v. 5, n. 2, p. 1-4, 1997.

FIAT, A. M.; JOLLÈS. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structure and physiological aspects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 5-30, 1989.

FIAT, A. M.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; JOLLÈS, P. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 301-310, 1993.

FITZGERALD, R. J. Potential uses of caseinophosphopeptides. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 451-457, 1998.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme **British Journal of Nutrition**, London, v. 84, suppl. 1, p. S33-S37, 2000.

FLORENTINO, E. R.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S.; PEREIRA, F. M. S.; SANTOS, F. N.; SILVA, S. F.; MARTINS, R. S. Caracterização do soro de queijo visando processo de aproveitamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 130, p. 30-32, 2005.

FOUCARD, T.; YMAN, M. A study on severe food reactions in Sweden – is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis? **Allergy**, Copenhagen, v. 54, n. 3, p. 261-265, 1999.

FRIEDMAN, M. Nutricional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v. 44, n. 1, p. 6-29, 1996.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington DC, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1991. 297 p.

GEISER, M. The wonders of whey protein. **NSCA's Performance Training Journal**, Colorado, v. 2, n. 5, p. 13-15, 2003.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J. Immunomodulatory properties of bovine milk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, n. 336, p. 31-35, 1998.

GOEPTAR, A. R.; KOEMAN, J. H.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; ALINK, G. M. Impact of digestion on the antimutagenic activity of the milk protein casein. **Nutrition Research**, New York, v. 17, n. 8, p. 1363-1379, 1997.

GOLD, P.; BOUNOUS, G. **Method of treatment of HIV-seropositive individuals with dietary whey proteins**. WHO Pat. n° 93/20831, 1993.

GOURLEY, G. R.; KREAMER, B. L.; COHNEN, M. Inhibition of β -glucuronidase by casein hydrolysate formula. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition**, New York, v. 25, n. 3, p. 267-272, sep. 1997.

GOVERS, M. J. A. P.; LAPRE, J. A.; DE VRIES, H. T.; VAN DER MEER, R. Dietary soybean protein compared with casein damages colonic epithelium and stimulates colonic epithelial proliferation in rats. **Journal of Nutrition**, London, v. 123, n. 10, p. 1709-1713, 1993.

GROZIAK, S. M.; MILLER, G. D. Natural bioactive substances in milk and colostrum: effects on the arterial blood pressure system. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84 (suppl. 1), p. S119-S125, 2000.

HAKKAK, R.; KOROURIANN, S.; SHELNUTT, S. R.; LENSING, S.; RONIS, M. J.; BADGER, T. M. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylben(a) anthracene-induced mammary tumors in female rats. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 113-117, 2000.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, H. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HARPER, W. J. **Biological Properties of Whey Components**. A Review. Chicago: The American Dairy Products Institute, 2000.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n. 2, p. 163-169, 2007.

HASLER, C. M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges. A Position Paper from the American Council on Science and Health. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, n. 12, p. 3772-3781, 2002.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 51-88, 2005.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Review Biochemistry Molecular Biology**, London, v. 30, n. 6, p. 445-600, 1995.

HILL, D. J.; HEIN, R. G.; CAMERON, D. J.; FRANCIS, D. E.; BINES, J. E. The natural history of intolerance to soy and extensively hydrolyzed formula in infants with multiple food protein intolerance. **Journal of Pediatric**, St. Louis, v. 135, n. 1, p. 118-121, 1999.

HIRAISHI, H.; TERANO, A.; OTA, S.; MUTOH, H.; SUGIMOTO, T.; HARADA, T.; RAZANDI, M.; IVEY, K. J. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. **Gastroenterology**, Amsterdam, v. 106, n. 5, p. 1199-1207, 1994.

HO, S. C.; LAM, S.; CHEN, Y.; SHAM, A.; LAU, J. Soy protein consumption and bone mass in early post menopausal Chinese women. **Osteoporosis International**, London, v. 14, n. 10, p. 835-842, 2003.

HODGSON J. M.; PUDDEY I. B.; BEILIN L. J.; MORI T. A.; CROFT K. D. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, n. 4, p. 728-732, 1998.

HOFFMAN; J.; FALVO, M. Protein-which is best? **Journal of Sports Science and Medicine**, New Jersey, v. 3, n. 3, p. 118-130, 2004.

HOLM, H.; RESELAND, J. E.; THORSEN, L. I.; FLATMARK, A.; HANSEN, L. E. Raw soybeans stimulate human pancreatic proteinase secretion. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 7, p. 1407-1416, 1992.

HOLT, C. The milk salts and their interaction with casein. In: FOX, P. F. (Ed.) **Advanced Dairy Chemistry 3**, London: Chapman e Hall, 1997. p. 233-256.

HOLT, P. R. Dairy Foods and Prevention of Colon Cancer: Human Studies. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 18, n. 5, p. 379S-391S, 1999.

HOPPE, C.; ANDERSEN, G. S.; JACOBSEN, S.; MOLGAARD, C.; FRIIS, H.; SANGILD, P. T.; MICHAELSEN, K. F. Fortified Blended Foods for Vulnerable Groups. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 138, n. 1, p. 145S–161S, 2008.

HOSONO, A.; SHASHIKANT, K. N.; OTANI, N. Antimutagenic activity of whole casein on the pepper-induced mutagenicity of streptomycin-dependent strain SD510 of Salmonella typhimurim TA 98. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 55, n. 3, p. 435-442, 1988.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.

HUFFMAN, L. M.; HARPER, J. Symposium: marketing dairy value through technology. Maximizing the value of milk through separation technologies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 10, p. 2238-2244, 1999.

HUGHES, W. P.S.; FLICKINGER, F. B. D.; MESSINA, M. J.; EMPIE, M. W. Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies. **Menopause**, New York, v. 13, n. 1, p. 831–839, 2006.

HULTBERG, B.; ANDERSON, A.; ISAKSSON, A. Thiol and redox reactive agents exert different effects on glutathione metabolism in HeLa cell cultures. **Clinica Chymica Acta**, Amsterdam, v. 283, n. 1-2, p. 21-31, 1999.

HUNTLEY, A.; ERNEST, E. A systemic review of the safety of black cohosh. **Menopause**, New York, v. 10, n. 1, p.58-64, 2003.

HURRELL, R. F. Bioavailability of iron. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 51 (suppl.), p. S4-S8, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride.** Washington, DC: National Academic, 1997.

JACOBUCCI, H. B. **Influência de várias fontes protéicas nos níveis sanguíneos e hepáticos de colesterol, triglicerídios e lipoproteínas.** Campinas, SP: UNICAMP, 1999. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 1999.

JACOBUCCI, H. B.; DIAS, N. F. G. P.; SGARBIERI, V. C.; BORGES, P. F. Z.; TANIKAWA, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein, and liver cholesterol. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 6, p. 905-915, 2001.

JANEWAY JR., C. A. How the immune system recognizes invaders. **Scientific American**, New York, v. 269, n. 3, p. 41-47, 1993

JAYAPRAKASHA, H. M.; BRUECKNER, H. Whey protein concentrate: a potential functional ingredient for food industry. **Journal of Food Science and Technology**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 189-204, 1999.

JAYAPRAKASHA, H. M.; PATEL, R. S.; RENNER, E. Permeation behaviour of buffalo milk cheddar cheese whey during ultrafiltration. **Journal of Food Research Zeitschrift Lebensm**, Untersuchung Forsch, v. 198, n. 3, p. 234-238, 1994.

JAYAPRAKASHA, H. M.; PATEL, R. S.; RENNER, E. **Production of functional whey protein concentrate by ultrafiltration.** In: Proceedings of 3Rd International Food Convention, Central Food Technological Research Institute, Mysore, India, 1993. p. 20-88.

JELEN, P; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. (Ed.). **Functional Foods.** Lancaster: Technomic, 1998. p. 357-380.

JOHNSON, T. L.; FUJIMOTO, B. A. S.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; PETERSON, D. Growth hormone alters lipid composition and increases the abundance of casein and lactalbumin mRNA in the MAC-T cell line. **Journal of Dairy Research**, London, v. 77, n. 2, p. 199-204, 2010.

JOLLÈS, P.; PARKER, F.; FLOC'D. Immunoestimulating substances from human casein. **Journal of Immunopharmacology**, New York, v. 3, n. 3-4, p. 363-369, 1982.

JONES, P. J. Clinical Nutrition: 7. Functional foods-more than just nutrition. **Canadian Medical Association Journal**, Toronto, v. 11, n. 12, p. 1555-1563, 2002

JONGEN, W. M. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; VAN BROEKHOVEN, L. W. Inhibitory effect of cheese and some food constituents on mutagenicity generated in *Vicia faba* after treatment with nitrite. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 141-145, 1987.

KALANT, H. Biotransformações das drogas. In: KALANT, K.; ROSCHLAU, W. H. E.; SILVA, P. (Eds.). **Princípios de farmacologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 30-40.

KALIMIN, N. L.; SHAKHALINA, K. L.; KULJAKINA, M. N. Quantitation of *Bacillus antracis* by using of soybean agglutinin conjugates. **Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiia Virusologiia**, Moskva, v. 6, p. 27-29, 1993.

KATZ, A. E. Flavonoid and botanical approaches to prostate health. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New York, v. 8, n. 6, p. 813-821, 1999.

KAWASE, M.; HASHIMATO, H.; HOSODA, M. Effect of administration of fermented milk contain whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 255-263, 2000.

KENNEDY, A. R. Letter to the editor: a reply to Liener. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 126, n. 2, p. 584-585, 1996.

KENNEDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p. 1406S-1412S, 1998.

KENNEDY, A. R. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, suppl. 3, p. 733S-743S, 1995.

KENNEDY, A. R.; BEAZER-BARCLAY, Y.; KINZLER, K.W.; NEWBERNE, P.M. Suppression of carcinogenesis in the intestines of Min mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. **Cancer Research**, Ulrich, v. 56, n. 4, p. 679-682, 1996.

KENNEDY, A. R.; BILLINGS, P. C.; MAKI, P. A.; NEWBERNE, P. Effects of various protease inhibitor preparations on oral carcinogenesis in hamsters induced by 7,12-dimethylbenz(a) anthracene. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 19, p. 191-200, 1993a.

KENNEDY, A. R.; SZUHAJ, B. F.; NEWBERNE, P. M.; BILLINGS, P. C. Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 281–302, 1993b.

KENNEDY, R. S.; KONOK, G. P.; BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; LEE, T. D. G. The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study. **Anticancer Research**, Ulrich, v. 15, n. 6B, p. 2643-2650, 1995.

KENT, K. D.; HARPER, W. J.; BOMSER, J. A. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 27–33, 2003.

KITTS, D. D. Antioxidant properties of casein phosphopeptides. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 16, n. 12, p. 549-554, 2005.

KITTS, D. D.; NAKAMURA, S. Calcium enriched casein phosphopeptides stimulates release of IL-6 cytokine in human epithelial intestinal cell line. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 73, n. 1, p. 44-48, 2006.

KITTS, D. D.; WEILER, K. A. Bioactive proteins and peptides from food sources: applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 9, n. 16, p. 1309-1323, 2003.

KITTS, D. D.; YUAN, V. V. Casein phosphopeptides and calcium bioavailability. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 31-35, 1992.

KONDO, H.; IJIRI, S.; ABE, K.; MAEDA, H.; ARAI, S. Inhibitory effect of oryzacystatins and a truncation mutant of the replication of a poliovirus in infected cells. **FEBS Letter**, Amsterdam, v. 299, n. 1, p. 48-50, 1992.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 9, p. 945-960, 2006.

KRIF, C. G. Casein micelle interactions. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 3-6, p.183-188, 1999.

KRISSANSEN, G. W. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 26, n. 6, p. 713S-723S, 2007.

LAMARTINIERE, C. A. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 1705S-1707S, 2000.

LANDS, L. C.; ISKANDAR, M.; BEAUDOIN, N.; MEEHAN, N.; DAULETBAEV, V. N.; BERTHIAUME, Y. Dietary supplementation with pressurized whey in patients with cystic fibrosis. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 13, n. 1, n. 77-82, 2010.

LI, J.; WANG, H.; STONER, G. D.; BRAY, T. M. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein malnourished mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, n. 10, p. 625-633, 2000.

LIENER, I. E. Soybean protease inhibitors and pancreatic carcinogenesis. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 126, p. 582-585, 1996.

LIMA, F. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2007.

LÖNNERDAL, BO; ERIC, L.; LIEN, E. L. Nutritional and physiologic significance of α -lactalbumin in infants. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 61, n. 9, p. 295-305, 2003.

MACMAHON, R. F.; WARREN, B. F.; JONES, C. J.; MAYBERRY, J. F.; PROBERT, C. S.; CORFIELD, A. P.; STODDART, R. W. South Asians with ulcerative colitis exhibited lectin binding compared with matched European cases. **Histochemical Journal**, London, v. 29, n. 6, p. 469-477, 1997.

MALMEZAT, D.; BREUILLE, P.; CAPITAN, P.; MIRANDA, P.; OBLED, C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 1239-1246, 2000.

MARIOTTI, F.; MAHÉ, S.; BENAMOUZIG, R.; LUENGO, C.; DARÉ, S.; GAUDICHON, C.; TOMÉ, D. Nutritional value of [^{15}N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 129, n. 11, p. 1992-1997, 1999.

MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MASSEY, L. K. Dairy food consumption, blood pressure, and stroke. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 7, p. 1875-1878, 2001.

MATHER, I. H. A review of proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 203-247, 2000.

MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; USHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine α -lactoalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosal injury in rats **Bioscience Biotechnology Biochemical**, Tokyo, v. 65, n. 5, p. 1104-1111, 2001.

MAUBOIS, J. L.; OLIVER, G. New applications of membrane processes. In: **IDF Special Issue**, n. 9201, Brussels: International Dairy Federation, Belgium, 1992. p. 15-22.

McCARRON, D. A.; HEANEY, R. P. Estimated healthcare savings associated with adequate dairy food intake. **Journal of Hypertension**, London, v. 17, n. 1, p. 88-97, 2004.

McINTOSH, G. H.; LE LEU, R. K. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 7, p. 1053-1066, 2001.

McINTOSH, G. H.; REGESTER, G. Q.; LE LEU, R. K.; ROYLE, P. J.; SMITHERS, G. W. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 4, p. 809-816, 1995.

McINTOSH, G. H.; ROYLE, P. J.; LE LEU, R. K.; ROGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. L.; KENWARD, R. S.; SMITHERS, G. W. Whey protein as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 425-434, 1998.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. **Pharmacology Therapeutics**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 155-194, 1991.

MESSINA M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 3, p. 439S-450S, 1999.

MESSINA M. J. Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, Suppl. 3, p. 567S-569S, 1995.

MESSINA M.; HUGHES, C. Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2003.

MESSINA, M.; BARNES, S.; SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens and breast cancer. **Lancet**, London, v. 350, p. 971-972, 1997.

METCALF, J. A.; GALLIN, J. I.; NAUSFEF, W. M.; ROOT, R. K. **Laboratory manual of neutrophil function**. New York: Raven Press, 1986.

MEZZAROBA, L. F. H. **Ação da α -lactalbumina e seus hidrolisados na inibição da úlcera gástrica induzida por diferentes agentes ulcerogênicos** (Dissertação de Mestrado). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2004.

MEZZAROBA, L. F. H. CARVALHO, J. E. PONEZI, A. N.; ANTONIO, M. A.; MONTEIRO, K. M. POSSENTI, A.; SGARBIERI, V. C. Antiulcerative properties of bovine alpha lactalbumin. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 9, p. 1005-1012, 2006.

MILK-POINT. Disponível na Internet, via: www.milkpoint.com.br (arquivo consultado em 16/08/2000).

MING, P. Descrição da indústria de produtos lácteos dos Estados Unidos. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 64-68, 2000.

MODLER, W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Ed.). **Food proteins: processing applications**. Willey: VCH, 2000. p. 81-88.

MORENO, I.; BALDINI, V. L. S.; LERAYER, A. L. S.; VIALTA, A. Modificações das proteínas do leite no processamento de queijos. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 26, p. 44-49, 2000.

MORENO, Y. M. F. **Influencia das proteínas de soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)**. Campinas, SP: UNICAMP, 2002. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) Universidade Estadual de Campinas, 2002.

MORR, C. V.; FOEGEDING E. A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food and Technology**, Chicago, v. 44, n. 4, p. 100-112, 1990.

MORR, C. V.; HÁ, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Florida, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MOURE, F.; RENDUELES, M.; DIAZ, M. Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. **Meat Science**, Barking, v. 64, n. 4, p. 391-398, 2003.

MUGHAN, P. J. Dietary protein quality in humans - An Overview. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 88, n. 3, p. 874-876, 2005.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. London: Kluber Academic, 1991.

MURKIES, A. L.; LOMBARD, C.; STRAUSS, B. J. G.; WILCOX, G.; BURGER, H. G.; MORTON, M. S. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: Effect of soy and wheat. **Journal of the Climacteric and Postmenopause**, New York, v. 21, n. 3, p. 189-195, 1995.

NAGAOKA, S.; KANAMARU, Y.; KUZUYA, Y. Effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats. **Agriculture and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 813-818, 1991.

NAGAOKA, S.; KANAMARU, Y.; KUZUYA, Y.; TOJIMA, T.; TOMOTSU, K. Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, n. 9, p. 1484-1485, 1992.

NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KAWAKAMI, N. SHIMIZU, H. Soy product intake and hot flashes in japanese women: results from a community-based prospective study. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 152, n. 8, p. 790-793, 2001.

NAGLER, A.; MORECK, S.; SLAVIN, S. The use of soybean agglutinin (SBA) for bone marrow (BM) purging and hematopoietic progenitor cell enrichment in clinical bone marrow transplantation. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 11, n. 2, p. 181-194, 1999.

NAGOURNEY, R. A. Garlic: medicinal food or nutritious medicine? **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 1, n. 1, p. 13-28, 1998.

NAIDU, A. S. (Ed.) **Lactoferrin**: Natural. Multifunctional. Antimicrobial. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Surveillance, epidemiology and end results program, 1975-2000. Division of Cancer Control and Population Sciences.

NESTEL, P. J.; POMEROY, S.; KAY, S.; KOMESAROFF, P.; BEHRING, J.; CAMERON, J. D.; WEST, L. Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, Springfield, v. 84, n. 3, p. 895, 898, 1999.

NESTEL, P. J.; YAMASHITA, T.; SASAHARA, T. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, n. 17, n. 2, p. 3392-3398, 1997.

NIKANDER, E.; KILKKINEN, A.; METSÄ-HEIKKILÄ, M.; ADLERCREUTZ, H.; PIETINEN, P.; TIITINEN, A.; YLIKORKALA, O. A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogens in treatment of menopause in breast cancer patients. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 101, n. 6, p. 1213-1220, 2003.

NOSSAL, G. J. V. Life, death and the immune system. **Scientific American**, New York, v. 269, n. 3, p. 53-60, 1993.

OTANI, H.; MONAI, M.; KAWASAKI, Y. KAWAKAMI, H. TANIMOTO, M. Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine kappa-caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. **Journal of Dairy Research**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 349-357, 1995.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.; SKURNIK, M. CONWAY, P. L. Inhibition of pathogen adhesion of β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 7, n. 11, p. 685-692, 1997.

OVERVIK, E.; GUSTAFSSON, J. A. Cooked food mutagens: current knowledge of formation and biological significance. **Mutagenesis**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 437, 446, 1990.

PARODI, P. W. A role for milk protein in cancer prevention. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 53, n. 1, p. 37-47, 1998.

PARODI, P. W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 13, n. 8, p. 813-828, 2007.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.

PAUIN, P. the key to added value: fractionation and the use of milk constituents. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 78 (suppl), p. 149-157, 1998.

PEARCE, R. J. In: ZADOW, J. G. (Ed.). **Whey and lactose processing**, New York: Elsevier Applied Science, 1992. p. 272-311.

PÉRÈS, J. M.; BOUHALLAB, S.; BUREAU, F.; MAUBOIS, J. L.; ARTHAN, P.; BOUGLÉ, D. Absorption digestive du fer lié au caséinophosphopeptide 1-25 de la β -caséine. **Le Lait**, Lyon, v. 77, n. 4, p. 433-440, 1997.

PERSSON, I.; JOHANSSON, T.; BERGLING, H.; MARJA-LIISA, D.; SEIDEGARD, J.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1: regulation and toxicological significance. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, Baltimore, v. 7, p. 25-36, 1995.

PHILIPINA, A. M.; RIZVI, S. S. H. Physicochemical properties of liquid virgin whey protein isolates. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 3, p. 236-246, 2008.

PICCOLO, N. S.; SERRA, M. C. V. F.; LEONARDI, D. F.; LIMA JR, E. M.; NOVAES, F. N.; CORREA, M. D.; CUNHA, L. R.; AMARAL, C. E. R.; PRESTES, M. A.; CUNHA, S. R.; PICCOLO, M. T. **Queimaduras**: diagnóstico e tratamento inicial. Projeto Diretrizes: Associação Brasileira de Cirurgia Plástica, 2008. 14 p.

PIHLANTO-LEPPALA, A. P.; KOSKINEN, P.; PIILOLA, K.; TUOMO-TUPASELA, H. K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 67, n. 1, p. 53-64, 2000.

PINNA, M. H.; LIZIEIRE, R. S. Leite de qualidade. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, n. 21, p. 123-126, 2000.

PINS, J. J.; KEENAN, J. M. The effects of a hydrolyzed whey protein supplement (Biozate® 1) on ACE activity and bradykinin. In: **Proceeding of 64th Annual Scientific Sessions of the American Diabetes Association**. Orlando: ADA, 2004.

POLLONI, M. A. R.; VASCONCELOS, M. E. L.; LAJOLO, F. M. Alimentos funcionais. **Qualidade em Alimentação**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 20-21, 2000.

POTTER, S. M. Soy – new health benefits associated with an ancient food. **Nutrition Today**, New York, v. 35, n. 2, p. 53-60, 2000.

POTTER, S. M. Soy protein and cardiovascular disease: The impact of bioactive components in soy. **Nutrition Review**, Washington, v. 56, n. 8, p. 231-235, 1998.

PRATA, A. S. **Proteínas do soro de sangue bovino**: propriedades nutritivas e funcionais. Dissertação de Mestrado. Campinas-SP, 2002, 147p. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

PRATA, A. S.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional, *in vitro*, das proteínas do soro de sangue bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 327-332, 2005.

PSZEZOLA, D. E. Putting soy and other nutraceuticals under the microscope. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 9, p. 112-117, 1999.

PUNIDADAS, P.; RIZVI, S. S. H. Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. **Food Research International**, Essex, v. 31, n. 4, p. 265-272, 1998.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; BARDOCZ, S.; GELENESER, E.; HOJOS, G. Novel dietary strategy for overcoming the antinutritional effects of soybean whey of high agglutinin content. **British Journal of Nutrition**, London, v. 77, n. 6, p. 933-945, 1997.

QUEIROGA, R. C. R. E.; CAMBUIM, R. B.; OLIVEIRA, M. E. G. O.; VIANNA, R. P. O T.; SOUZA, E. L. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo C distribuído pelo programa "Leite da Paraíba". **Nutrire**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 97-109, 2010.

RALKIN, P.; BARNARD, C.; MEYLHEUC, T.; VASSEUR, J.; COUTROIS, F. Production of whey protein aggregates with controlled end-use properties. **Le Lait**, Lyon, v. 87, n. 4-5, p. 337-348, 2007.

RASTOGI, L.; PATNAIK, G. K.; DIKSHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury rats. **Pharmacological Research**, London, v. 38, n. 2, p. 125-132, 1998.

REGESTER, G. P.; McINTOSH, G. H.; LEE, V. W. K.; SMITHERS, G. W. Whey protein as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, Waterloo, v. 48, n. 3, p. 123-127, 1996.

RENNER, E.; Abd El-SALAM. **Application of ultrafiltration in the dairy industry**. London: Elsevier Applied Science, 1991.

RIBEIRO, P. C. Terapia nutricional na sepse. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 175-178, 2004.

RODRIGUES, S. L. C.; MOREIRA, R. L. S.; CARDOSO, M. H.; MERÇON, F. Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (suplemento), p. 98-101, 2003.

ROSANELI, C. F. **Atividade anti-ulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais em ratos** (Dissertação de Mestrado). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 81p.

ROSANELI, C. F.; BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SGARBIERI, V. C. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 7, n. 3, p. 309-314, 2004.

ROSANELI, C. F.; SGARBIERI, V. C.; BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J.E. Efeito de um concentrado de soro de leite bovino (CSL) em úlcera gástrica induzida por etanol em modelos experimentais. In: 4° Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. 2001, Campinas. **Anais**. Campinas: Unicamp. 350p.

ROSEMBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, Singapore, v. 1, n. 6, p. 12-19, 1995.

RUAN, E. A.; RAO, S.; BURDIK, S.; STRYKER, S. J.; TELFORD, G. L.; OTHERSON, M. F.; OPARA, E. C.; KOCH, T. R. Glutathione levels in chronic inflammatory disorders of the human colon. **Nutrition Research**, New York, v. 17, n. 3, p. 463-473, 1997.

RUSU, D.; DROUIN, R. J.; POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.; POUBELE, P. E. A Bovine Whey Protein Extract Can Enhance Innate Immunity by Priming Normal Human Blood Neutrophils. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 139, p. 386-393, 2009.

RUTHERFURD, K. L.; GILL, H. S. Peptides affecting coagulation. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84 (suppl 1), p. S99-S102, 2000.

SACKS, F. M.; LICHTENSTEIN, A.; VAN HORN, L.; HARRIS, H.; KRIS-ETHERTON, P.; WINSTON, M. Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health. **Circulation**, Dallas, v. 113, p. 1034-1044, 2006.

SALGADO, J. M. Novas fronteiras da ciência da nutrição no Brasil e no mundo. In: Simpósio Alimentos Funcionais para o Novo Milênio: qualidade de vida e saúde. 2000, Campinas. **Anais**. Campinas: Unicamp, 2000. p. 18-19.

SARON, M. L. G.; SARON, C.; LERAYER, A. L. S.; SGARBIERI, V. C. Uso do permeado do soro de leite bovino e de lactulose como potenciais fortificadores dos meios MRS e MRS-modificado para o cultivo de espécies de bactérias probióticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, p. 35-41, 2007.

SATIA-ABOUT A. J.; GALANKO, J. A.; MARTIN, C. F. Food Groups and colon cancer risk in African Americans and Caucasians. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 109, n. 5, p. 728-736, 2004.

SCAMBIA, G.; MANGO, D.; SIGNORILE, P.G. Clinical effects of the standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. **Menopause**, New York, v. 7, n. 2, p. 105, 111, 2000.

SCHAAFSMA, F. The protein digestibility corrected amino acid score. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 7, p. 1865S-1867S, 2000.

SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) - a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 88, p. 988-94, 2005.

SCHANBACHER, F. L.; TALHOUK, R. S.; MURRAY, F. A.; GHERMAN, L. I.; WILLETT, L. B. Milk-borne bioactive peptides. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 8, n. 5/6, p. 393-403, 1998.

SCHLIMME, E.; MEISEL, H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. **Nahrung**, Weinheim, v. 39, n. 1, p. 1-20, 1995.

SCOTT, R.; ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Cheesemaking practice**. 3. ed. Washington DC: Chapman e Hall, 1998. 437p.

SEE, D.; MASON, S.; ROSHAN, R. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers. **Immunological Investigations**, New York, v. 31, n. 2, p. 137-153, 2002.

SEKINE, K.; WATANABE, E.; NAKAMURA, J. Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F 344 rats. **Japan Cancer Research**, Tokyo, v. 88, n. 6, p. 523-526, 1997.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p. 1333S-1346S, 1998.

SGARBIERI, V. C. Food protein and peptides presenting specific promotion to human health (a review). In: **Food for health in the Pacific Rim**. Trumbull: Food and Nutrition Conn, 1999, p. 335-352.

SGARBIERI, V. C. Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações e modificações. São Paulo: Varela, 517 p. 1996.

SGARBIERI, V. C. RANGEL, H. A.; ZINSLY, P. F.; PACHECO, M. T. B.; PEREIRA DIAS, N. F. G. Novel Nutritional of milk Proteins. In: **Proceedings of the 4th International Conference of Food Science and Technology 2000**. Wuxi, China. Wuxi: University of Light Industry/National Association of Food, 2000. p. 196-209.

SHAN, N. P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84 (suppl. 1), p. S3-10, 2000.

SILVA, E. P.; SILVA, D. F. S.; JANSEN, J. T.; LUDVIG, J. C.; NOGARA, M. A. S. Úlceras Péptica. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 54, p. 83-96, 1997.

SILVA, M. R. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com alto teor de oligopeptídios e elevada atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina, utilizando a enzima pancreatina e a papaína**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Minas Gerais, MG. 2010. 89p.

SINDAYIKENGERA, S.; WENSHUI, X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 45, p. 645-656, 2005.

SIQUEIRA, I. M. C.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; GLORIA, M. B. A. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 1-35, 2002.

SLATTERY, M. L.; NEUHAUSEN, S. L.; HOFFMAN, M. Dietary Calcium, vitamin D, VDR Genotypes and colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, New York, v. 111, n. 6, p. 750-756, 2004.

SMITHERS, G. H.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; KIRTHER, J. A.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; McINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; REGESTER, G. O. Symposium: advances in dairy foods processing and engineering. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.

SOLTAN, M. A. Influence of dietary glutamine supplementation on growth performance, small intestinal morphology, immune response and some blood parameters of broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 8, n. 1, p. 60-68, 2009.

SOY INGREDIENTS – Soy Protein Concentrates retain high levels of isoflavones. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 6, p. 144-145, 1999.

SPITSBERG, V. L. Invited Review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 8, p. 2289-2294, 2005.

SPITSBERG, V. L.; GOREWIT, R. C. Solubilization and purification of xanthine oxidase from milk fat globule membrane. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 13, n. 2, p. 229-234, 1998.

SPREER, E. **Milk as a raw material and food. In: Milk and dairy product technology**. New York: Marcel Dekker, 1998.

STRAND, F. T. **Denatured bovine serum albumin milk products and method therefore**. US patent 5 473 050, 1995.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TERASHIMA, S.; TAKANO, Y.; OHORI, T.; KANNO, T.; KIMURA, T.; MOTOKI, R.; KAWAGUCHI, T. Soybean agglutinin binding as a useful prognostic indicator in stomach cancer. **Surgery Today**, Tokyo, v. 27, n. 4, p. 293-297, 1997.

TIKKANEN, M. J.; WAHALA, K.; OJALA, S.; VIHMA, V.; ADLECRERUTZ, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington DC, v. 95, n. 6, p. P3106-P3110, 1998.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da glutathione s-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 243-248, 2004.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. A. M. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione-S-transferase de fígado bovino. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 302-307, 2006.

TRABER, M. G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants. **Mineral and Electrolytic Metabolism**, Basel, v. 23, n. 3, p. 135-139, 1997.

TSAI, W. Y.; CHANG, C. H.; CHEN, C. Enhancing Effect of Patented Whey Protein Isolate (Immunocal) on Cytotoxicity of an Anticancer Drug. **Nutrition and Cancer**, Mahwah, v. 38, n. 2, p. 200-208, 2000.

TSUDA, H.; SEKINE, K. Milk components as cancer chemo preventive agents. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 1, n. 4, p. 277-282, 2000.

TSUDA, H.; SEKINE, K.; FUJITA, K. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms-a review of experimental and clinical studies. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 80, n. 1, p. 131-136, 2002.

U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003. U.S. Mortality Public Use Data Tape. National Center for health Statistics, 2001.

UPMALIS, D. H.; LOBO, R.; BRADLEY, L.; WARREN, M. CONE, F. L.; LAMIA, C.A. Vasomotor symptom relief by isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo controlled study. **Menopause**, New York, v. 7, n. 4, p. 236-242, 2000.

USDA - U.S. DEPARTMENT of AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 16, 2003.

USDEC - U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL. **Reference Manual for U. S. Whey and Lactose Products**. Arlington: U. S. Dairy Export Council, 2003.

VAN BOEKEL, M. A. J. S.; WEERENS, C. N. J. M.; HOLSTRA, A.; SCHEIDTWEILER, C. E.; ALINK, G. M. Antimutagenic effects of casein and its digestion products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 731-737, 1993.

VAN DER SCHOUW, Y. T.; KLEIJN, M. J.; PEETERS, P. H.; GROBBEE, D. E. Phyto-estrogens and cardiovascular disease risk. **Nutrition, metabolism and cardiovascular disease**, Heidelberg, v. 10, n. 3, p. 154-167, 2000.

VANNUCCHI, H.; MARCHINI, J. S. **Nutrição e metabolismo: nutrição clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 364 p.

VENTURINI, S. K.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do leite**, Boletim Técnico, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2007.

VON HOFE, E.; NEWBERNE, P. M.; KENNEDY, A. R. Inhibition of *N*-nitrosomethylbenzylamine induced esophageal neoplasms by the Bowman-Birk protease inhibitor. **Carcinogenesis**, New York, v. 12, n. 12, p. 2147-2150, 1991.

WAKULICH, C. A.; TEPPERMAN, B. L. Role of glutathione in nitric oxide-mediated injury to rat gastric mucosal cells. **European Journal of Pharmacology**, Tokyo, v. 319, n. 2/3, p. 333-341, 1997.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 42, n. 4, p. 353-375, 2002.

WARNER, E. A.; KANEKAMIAN, K. D.; ANDREWS, A. T. Bioactivity of milk proteins: 1. Anticariogenicity of whey proteins. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 54, n. 4, p. 151-153, 2001.

WEISSMAN, I. L.; COOPER, M. D. How the immune system develops. **Scientific American**, New York, v. 269, n. 3, p. 65-72, 1993.

WONG, C. W.; LIU, A. H.; REGESTER, G. O.; FRANCIS, G. L.; WATSON, D. L. Influence of whey and purified whey proteins on neutrophil function in sheep. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 22, p. 281-288, 1997.

WONG, C. W.; SEOW, H. F.; LIU, A. I. H.; HUSBAND, A. J.; SMITHERS, G. W.; WATSON, D. L. Modulation of immune responses by bovine β -casein. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 74, n. 4, p. 323-329, 1996.

WONG, C. W.; WATSON, D. L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 62, n. 2, p. 359-368, 1995.

WONG, D. W. S.; CAMIRANT, W. M.; PAVLATH, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Florida, v. 36, n.8, p. 807-844, 1996.

WOOTEN, M. J.; PRICE, W. The role of dairy and dairy nutrients in the diet of African Americans. **Journal of the National Medical Association**, Washington DC, v. 96, n. 12, p. 15-315, 2004.

WU, S.; PEREZ, M.; PUYOL, P. SAWYER, L. Beta-lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 1, p. 170-174, 1998.

XU, R. J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. In: WHITAKER, J. R.; HAARD, N. F.; CHALMAKER, C. F.; SINGER, R. (Ed.). **Food for Health in the Pacific Rim**. Trumbull: Food and Nutrition, 1999. p. 291-301.

YAMAGUCHI, N.; YAJIMA, N.; ISHIDA, M.; SHIMADA, T. HIRAISHI, H.; Protection of cultured gastric cells against ter-butyl-hidroperoxide by glutathione isopropyl ester. **European Journal of Pharmacology**, Tokyo, v. 351, n. 3, p. 363-369, 1998.

YEE, K. W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 290, n. 1-2, p. 125-137, 2007.

YONG WU, Y.; ZHANG, X.; BARDAG-GORCE, F.; ROBEL, R. C. V.; AGUILO, J. CHEN, L.; ZENG, Y.; HWANG, K.; FRENCH, S. W.; LU, S. C.; WAN, Y. J. Retinoid α receptor α regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 65, n. 3, p. 550-557, 2004.

YOO, Y. C.; WATANABE, S.; WATANABE, R. Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 443, p. 285-291, 1998.

YOSHIDA, S.; XIUYUN, Y. E. The binding ability of bovine milk caseins to mutagenic heterocyclic amines. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 4958-4961, p. 958-961, 1992.

ZEIGER, R. S.; SAMPSON, H. A.; BOCK, S. A.; BURKS A. W. Jr.; HARDEN, K.; NOONE, S.; MARTIN, D.; LEUNG, S.; WILSON, G. Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 134, n. 5, p. 614-622, 1999.

ZHOU, J. R. Soy and the prevention of lifestyle-related diseases. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 31, suppl. 2, p. S14-S19, 2004.

ZHOU, J. R.; YU, L.; ZONG, Y.; BLACKBURN, G. L. Soy phytochemicals and tea bioactive compounds synergistically inhibit androgen-sensitive human prostate tumors in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, n. 2, p. 516-521, 2003.

CAPITULO 2

PROPRIEDADES IMUNOESTIMULATÓRIAS DE ALGUMAS PROTEÍNAS DE USO CORRENTE EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL E HUMANA

RESUMO

Neste capítulo as pesquisas tiveram como principais objetivos: 1. confirmar diferenças relatadas na literatura do poder imunoestimulatório entre algumas das principais proteínas alimentícias; 2. verificar possível compatibilidade (sinergismo) ou incompatibilidade (antagonismo) imunológico entre proteínas, quando usadas em misturas na dieta; 3. verificar os efeitos de métodos de fabricação e outros tratamentos das proteínas sobre seu poder imunoestimulatório. Dos vários preparados protéicos utilizados isolados de proteína de soro de leite, preparados na Nova Zelândia (NZ) e na França (Ren); concentrado de proteína de soro de leite (CSD), preparado no ITAL, Campinas; caseína preparada na forma micelar (CM) e uma caseína comercial (CC); isolado protéico de soja (IPS); um concentrado de globulinas de soro bovino (BSG) e albumina de soro de sangue bovino (BSA); o CSD foi o que apresentou maior poder imunoestimulante ($p < 0,05$). Quando misturados em diferentes proporções aos outros concentrados e/ou isolados protéicos, todos provocaram diminuição do poder imunoestimulatório do CSD, com exceção da BSA que mostrou identidade e/ou sinergismo com o CSD. O CSD manteve seu elevado poder imunoestimulatório, quando introduzido na dieta na faixa de concentração de 7,5 a 20% da dieta. O processo de desidratação (liofilização ou “spray drying” não influenciou na atividade imunoestimulante do CSD. A irradiação por raios-gama até 3kG não afetou as propriedades imunológicas do CSD, porém, tratamento acima de 5kG diminuiu essa atividade. Tratamentos térmicos acima de 60°C, exceto a pasteurização (72°C, 15 seg.) prejudicaram a atividade imunológica das proteínas do soro de leite.

2.1 INTRODUÇÃO

O sistema imune constitui-se de células e moléculas responsáveis pela imunidade, protegendo o organismo de agentes infecciosos que existem no ambiente e de substâncias estranhas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos, sem que tais reações impliquem conseqüências fisiológicas ou patológicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997; CALDER; KEW, 2002).

A resposta imune específica pode ser classificada em humoral e celular, dependendo dos componentes do sistema mediador da resposta. No primeiro caso a resposta imune é mediada por linfócitos B que ativados, diferenciam-se em plasmócitos capazes de produzir anticorpos. A imunidade humoral constitui o principal mecanismo de defesa contra microrganismos e suas toxinas, aos quais os anticorpos se ligam, promovendo sua neutralização. No segundo caso, a resposta imune é mediada por linfócitos T, sendo conhecida por imunidade celular. Há duas classes principais de linfócitos T: os citotóxicos, que matam as células infectadas por vírus e as células T auxiliares e inflamatórias, com função ativadora sobre outras células, como os linfócitos B e os macrófagos (STITES; TERR; PARSLOW, 2000).

A avaliação da resposta de anticorpos na imunidade humoral é relativamente simples, enquanto que a imunidade mediada por células T, imunidade celular é tecnicamente bem mais difícil de ser medida (JANEWAY et al., 2000).

Os efeitos dos nutrientes da dieta no sistema imune e na resposta imune são complexos (CUNNINGHAM-RUNDLES, 1994; 1998). Os nutrientes derivados de proteínas da dieta, carboidratos e lipídios, bem como micronutrientes, vitaminas e minerais interagem sistematicamente com as células do sistema imunológico na circulação sanguínea, nos linfonodos e no sistema imune especializado do trato gastrointestinal (PRINDULL; AHMAD, 1993). Os efeitos de um nutriente isolado dependem de sua concentração e da interação com outros nutrientes. A idade do animal também é fator importante (CHANDRA, 1993a; b).

Nos últimos anos foram feitos muitos estudos “in vitro” e “in vivo” visando identificar e caracterizar os componentes do leite bovino capazes de modular o sistema imune, compreendendo tanto os estímulos para aumentar a intensidade da resposta quanto para suprimi-la. O efeito potencial verificado com os componentes do leite para inibir a resposta imune é tão importante em nível fisiológico quanto o efeito de melhorar essa resposta (KULKARNI; KARLSSON, 1993 apud CROSS; GILL, 2000).

A maioria das pesquisas aborda a imunidade específica, associada à reação antígeno-anticorpo e, mais especificamente, a ação dos linfócitos B, que produzem anticorpos e T, no reconhecimento do antígeno, produção e modulação da resposta imune via secreção de citocinas. Poucas pesquisas focaram a resposta imune não específica ou inata. A distinção entre componentes específicos e não específicos da resposta imune é arbitrária, tendo em vista que durante uma reação “in vivo” com a presença de um agente estranho o sistema imune age como um todo, conferindo proteção ao organismo (GILL; RUTHERFURD; CROSS, 2000).

Há evidências de que proteínas de boa qualidade, identificadas de acordo com sua capacidade de promover crescimento, possam diferir na capacidade imunomoduladora. Estudos efetuados com camundongos adultos e jovens encontraram maior efeito imunomodulador para as proteínas de soro de leite, comparadas à caseína e várias outras proteínas de origem animal, vegetal e de algas. A maior parte dessas informações relaciona-se à resposta primária dependente do timo em resposta ao desafio com hemácias de carneiro, dosados em termos de contagem de células formadoras de placas (WONG; WATSON, 1995; WOODWARD, 1998).

Os efeitos imunomoduladores das proteínas de soro na formação de anticorpos específicos estão muito bem documentados na literatura. Além destes efeitos verificou-se que camundongos alimentados com concentrado protéico de soro expressaram elevados níveis de anticorpos após administração de diferentes vacinas (LOW et al., 2003). Esses efeitos foram similares àqueles encontrados por Wong e Watson (1995), quando também verificaram um aumento da imunidade

celular. As proteínas de soro contêm altas concentrações de cisteína e a atividade imunomoduladora apresentada por essas proteínas foi atribuída à sua habilidade em aumentar os níveis de glutathione (GSH) nos órgãos linfóides em resposta a um desafio antigênico. Esses achados foram à base de um ensaio clínico preliminar, no qual dois indivíduos HIV positivos exibiram elevação modesta nos níveis séricos de glutathione celular após três meses de suplementação com concentrado protéico de soro (BOUNOUS et al., 1993; BOUNOUS, 2000).

Estudos mais recentes efetuados com crianças portadoras do vírus HIV (MORENO, 2002; MORENO et al., 2005) mostraram a eficácia do preparado CSD utilizado na presente tese, na elevação da glutathione eritrocitária e na melhora do sistema imunológico, demonstrado pela elevação da relação linfocitária TCD_4/TCD_8 e da diminuição da ocorrência de infecções oportunistas das crianças recebendo CSD versus placebo (maltodextrina).

Estudos efetuados com animais alimentados com produtos de soro contendo altas concentrações de imunoglobulinas (Ig) e albumina sérica bovina (BSA) exibiu maior efeito nos teores de GSH. A BSA é uma boa fonte de aminoácidos essenciais, correspondendo de 5 a 10% das proteínas de soro. Alguns estudos verificaram aumento na síntese de GSH em animais alimentados com dietas de soro contendo altos teores de BSA. Do mesmo modo que as Igs, a fração BSA contém os aminoácidos glutamina e cisteína que fazem parte da GSH (BEAULIEU; DUPONT; LEMIEUX, 2006).

2.2 OBJETIVOS

- Avaliar comparativamente o potencial imunomodulador de várias fontes protéicas isoladamente ou em combinações, quando incorporadas em uma dieta semi-sintética padrão para roedores.
- Determinar as concentrações e combinações mais efetivas de proteínas na dieta padrão para o estímulo imunológico.

- Avaliar o efeito de variáveis do processamento, particularmente fluxograma de produção, tratamento térmico e irradiação gama no poder imunestimulatório do produto protéico.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Fontes protéicas utilizadas

Para o estudo do efeito imunestimulador de proteínas da dieta utilizaram-se as seguintes fontes protéicas: caseína comercial (CC), adquirida da M Cassab, São Paulo, SP; isolado protéico de soja (IPS) da marca Samprosoy 90, obtida da Empresa Ceval, Esteio, RS; isolado protéico de soro de leite bovino (Ren) produzido em planta piloto em Rennes (Fr); isolado protéico de soro de leite bovino (NZ) adquirido da Empresa New Zealand Milk Product (NZMP), São Paulo, SP; hidrolisado de colágeno bovino (HC) gentilmente fornecido pela Empresa “Gelita South América”, Cotia, SP; albumina sérica bovina (BSA) e globulina sérica bovina (BSG) obtida em laboratório e gentilmente cedida por Prata (2002); caseína na forma micelar (CM) obtida em planta piloto (Figura 1) e gentilmente cedida por Roman (2002); concentrado de soro doce desidratado por liofilização (CSD-L) e desidratado em “spray Dryer” (CSD-S), segundo metodologia descrita por Zinsly e colaboradores (2001) (Figura 2) e Dias (2004).

2.3.2 Métodos de preparação

Obtenção do concentrado de micelas de caseína (CM) (Figura 1).

Processo de obtenção do concentrado de soro doce CSD (Figura 2).

Processo de obtenção das frações séricas bovina (BSG e BSA) (figura 3).

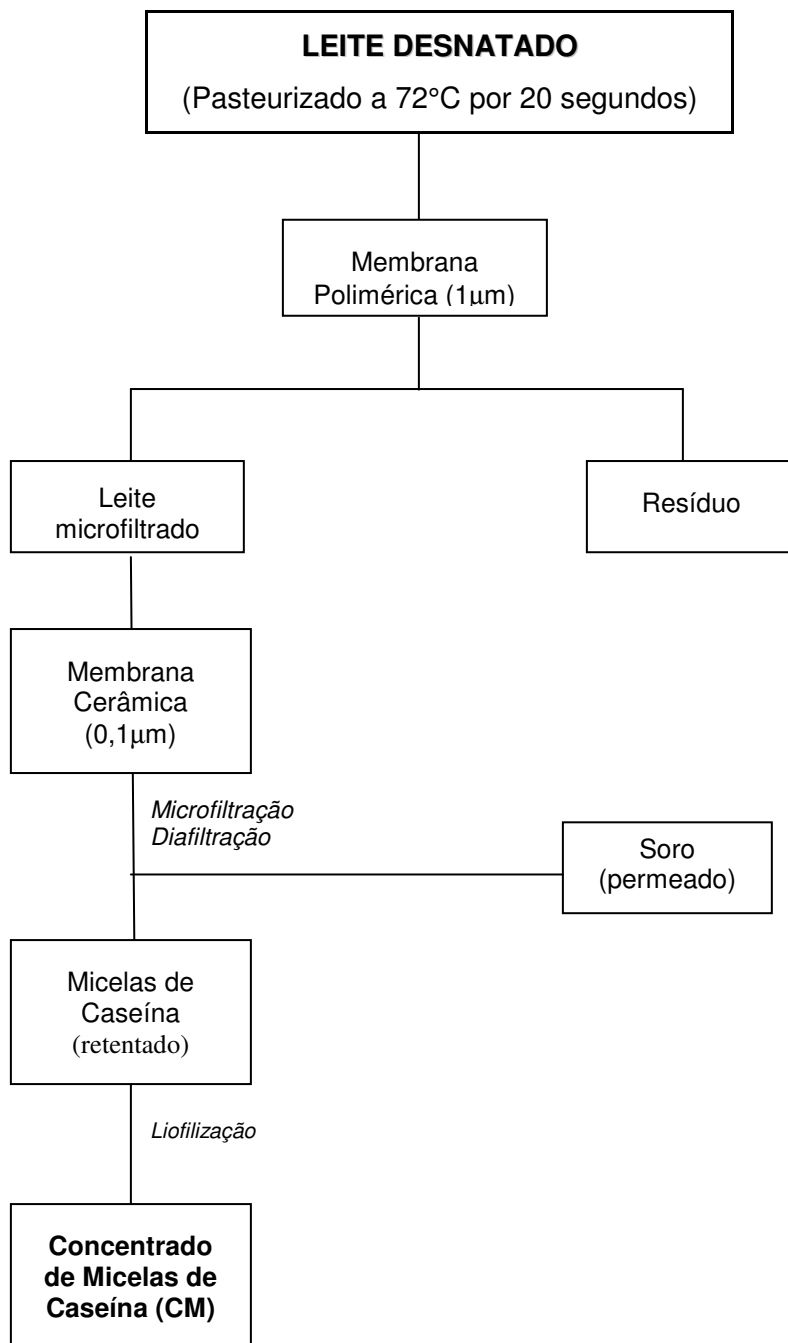


Figura 1 - Processo de obtenção das micelas de caseína (CM) por microfiltração seguido de diafiltração a partir do leite bovino fluído (ROMAN, 2002).

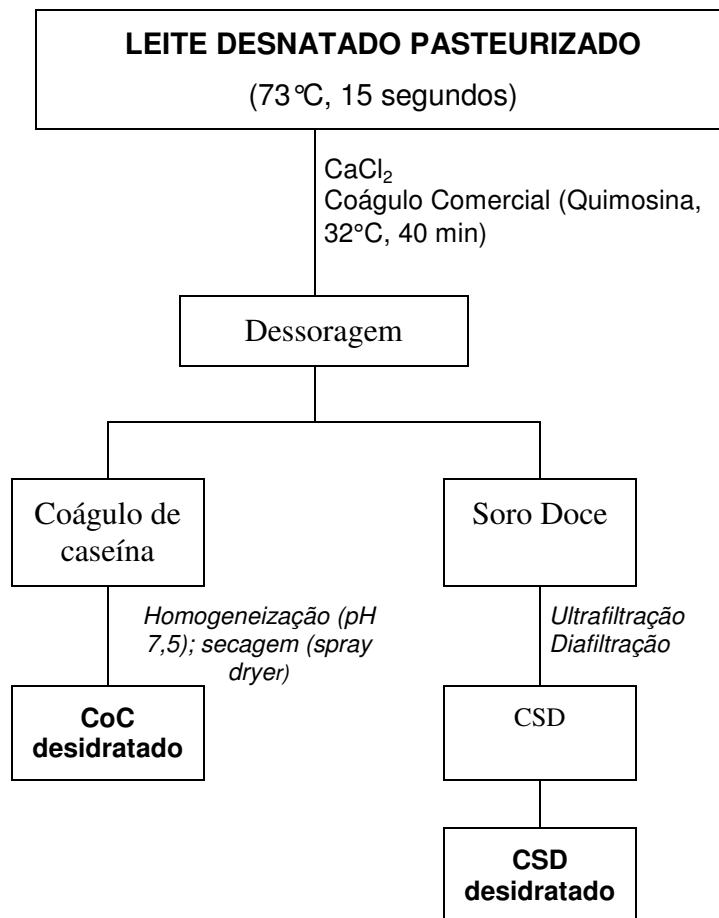


Figura 2 - Processo de obtenção do coágulo de caseína desidratado - CoC e concentrado protéico de soro doce - CSD (BORGES et al., 2001).

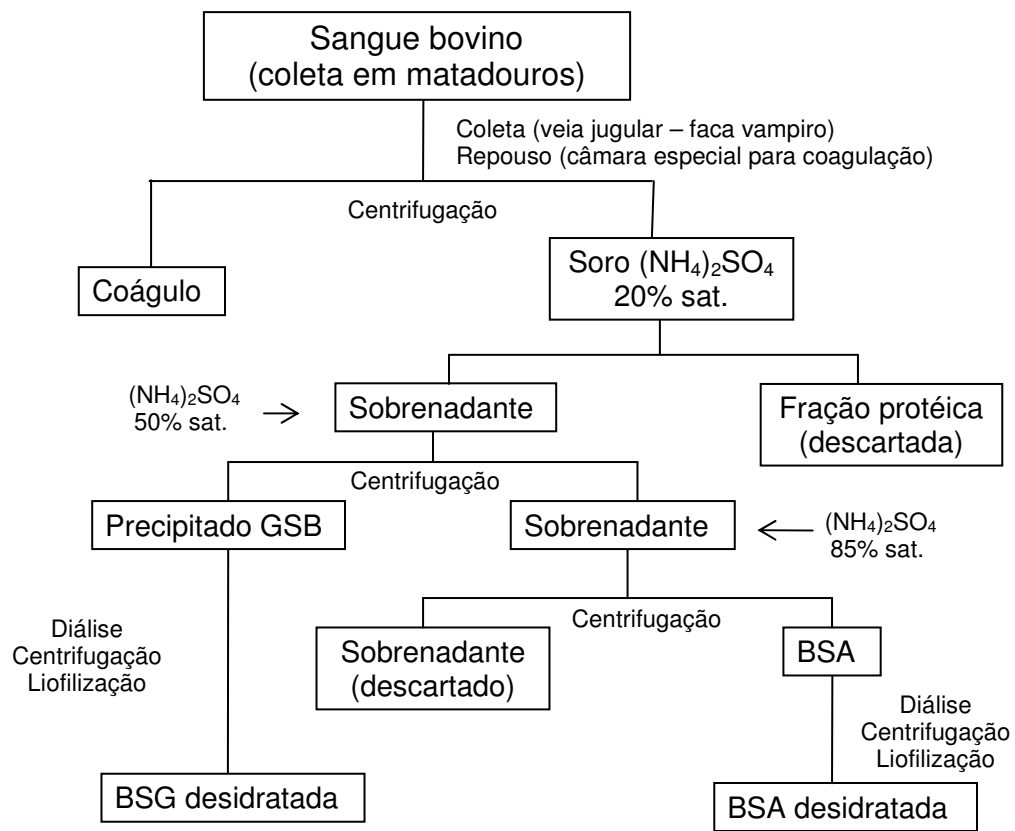


Figura 3 - Processo de obtenção das frações globulina sérica bovina (BSG) e albumina sérica bovina (BSA) (PRATA, 2002).

2.3.3 Caracterização dos materiais utilizados (fontes protéicas)

♦ Composição centesimal

- **Nitrogênio Total:** determinado pelo método microKjeldahl, segundo método descrito na AOAC (1990).
- **Umidade e sólidos totais:** foram determinados de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990). Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento até peso constante e pesagem do resíduo sólido.
- **Resíduo mineral (cinza):** determinado de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990). Baseia-se na determinação do resíduo inorgânico resultante da calcinação de toda matéria orgânica da amostra.
- **Lipídios Totais:** determinados pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959), levando-se em conta as proporções recomendadas entre os solventes clorofórmio, metanol e água destilada, 1:2:0,8 para a primeira diluição e 2:2:1,8 para a segunda diluição. Após a eliminação do solvente os lipídios extraídos foram determinados gravimetricamente.
- **Lactose:** a determinação de lactose foi feita de acordo com metodologia de Acton (1977).

2.3.4. Poder imunoestimulante de diferentes proteínas da dieta

Foram delineados 8 protocolos experimentais que diferiram entre si quanto às fontes e concentrações protéicas, buscando verificar qual tipo e concentração promoveria maior efeito imunomodulador.

Ao todo foram realizados 8 ensaios, cujos protocolos são esquematicamente apresentados nas Figuras 4 a 10.

2.3.5 Monitoramento do efeito imunomodulador

- ♦ **Ensaio imunológico para contagem de células formadoras de placas (CFP)** – Para a imunização dos animais (camundongos machos A/UNl) utilizou-se suspensão de hemácias de carneiro padronizadas, obtidas semanalmente em solução de Alsever, do Biotério Boa Vista, Campinas, SP. Após 16 dias recebendo a dieta, os animais foram imunizados por injeção subcutânea contendo 5×10^6 hemácias de carneiro lavadas em tampão borato 0,05M (adicionado de sais de cálcio e magnésio). A contagem de CFP foi efetuada de acordo com o método modificado de Cunningham e Szenberg (1968). Os animais foram mortos 5 dias após a imunização quando, de acordo com a literatura e confirmado em testes laboratoriais preliminares, acontece o pico de resposta. Os baços foram retirados e alíquotas de suspensão de suas células foram colocadas a reagir com hemácias e complemento de cobaia, em lâminas tratadas com agarose. Após tempo previamente determinado a reação foi interrompida e a contagem de placas foi efetuada com auxílio de lupa (BOUNOUS; GOLD, 1991).

2.3.6 Ensaios biológicos

- ♦ **Dietas experimentais**

As dietas foram formuladas de acordo com a AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993) modificadas quanto às fontes protéicas e as concentrações de proteínas, sendo isoprotéicas e isocalóricas. As fontes protéicas utilizadas em cada ensaio bem como suas concentrações estão apresentadas nos protocolos das figuras 4 a 10.

♦ Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos machos SPF (“specific pathogen free”) da linhagem A/Uni imunocompetentes, de 6-8 semanas de idade, obtidos do Centro Multidisciplinar de Experimentação Biológica, CEMIB/Unicamp, Campinas, SP, sendo 10 animais/tratamento. Eles foram transportados para o Biotério do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, onde foram realizados os experimentos. Em todos os ensaios os animais foram separados em grupos, de modo que não houvesse grandes diferenças entre as médias de peso dos grupos. Foram mantidos em caixas plásticas próprias para camundongos (5 animais/caixa), forradas com maravalha (camas) e colocadas em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz (claro e escuro) de 12 horas. Os grupos foram aleatoriamente distribuídos entre os tratamentos. As dietas dos comedouros foram trocadas diariamente, a água e as camas, 2 vezes por semana. Água e dieta foram oferecidas “ad libitum”.

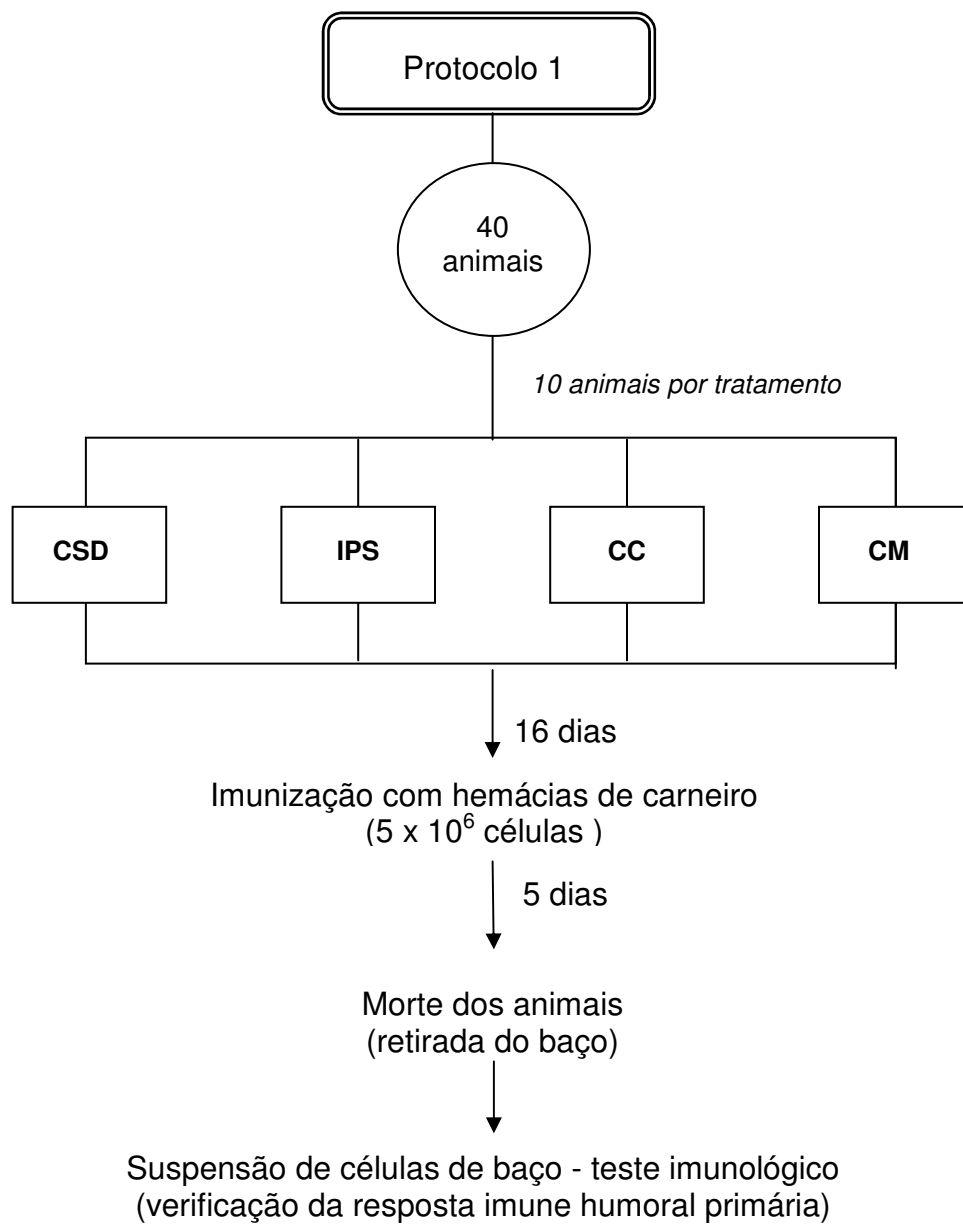


Figura 4 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni alimentados com dietas contendo 20% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CC (caseína comercial) e CM (caseína micelar).

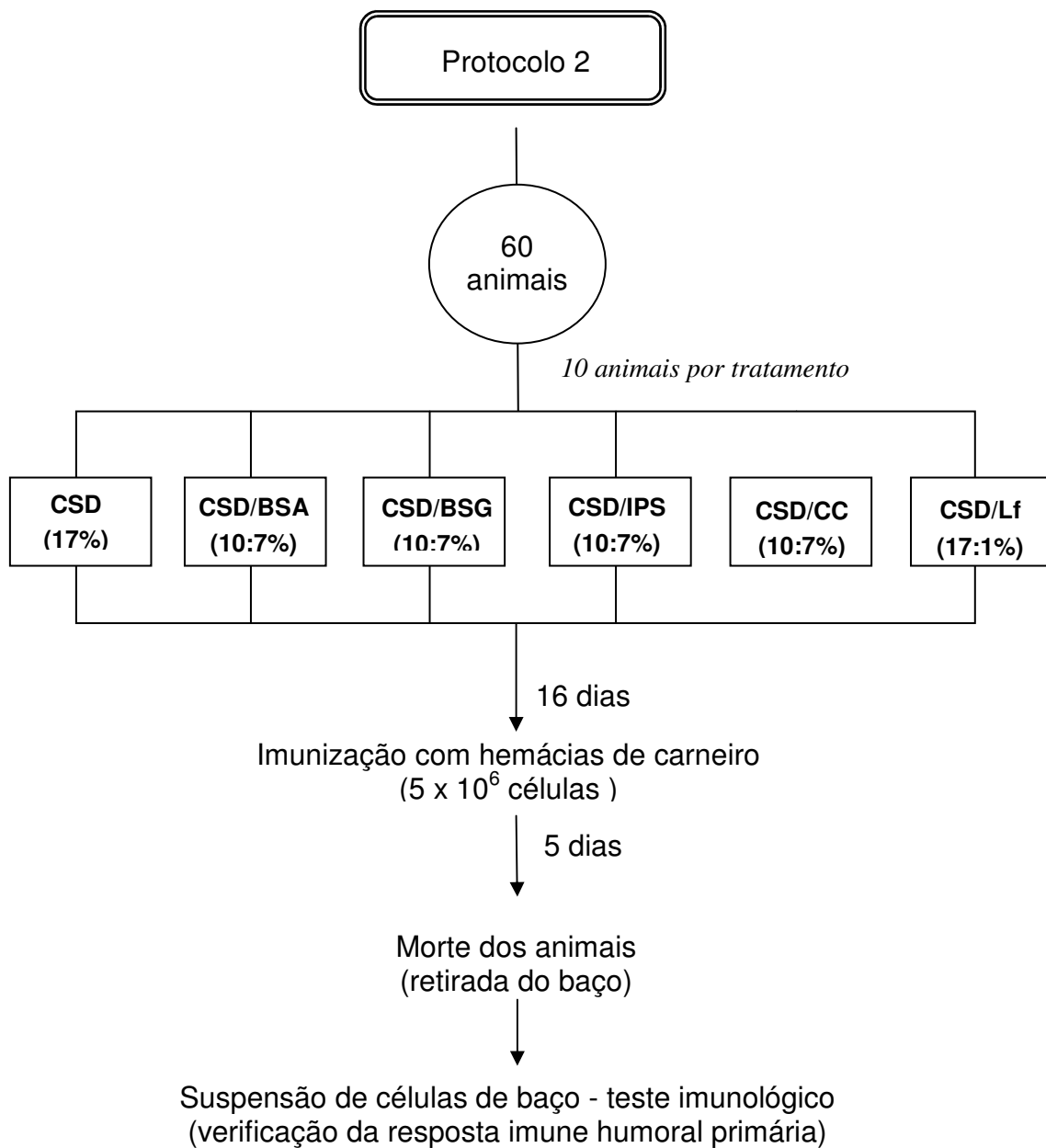


Figura 5 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 17% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); misturas com 10% de CSD e 7% de uma das proteínas: BSA (albumina de soro bovino), BSG (globulina sérica bovina), IPS (isolado protéico de soja) e CC (caseína comercial); CSD/Lf (17:1), concentrado protéico de soro doce/lactoferrina (17%/1%).

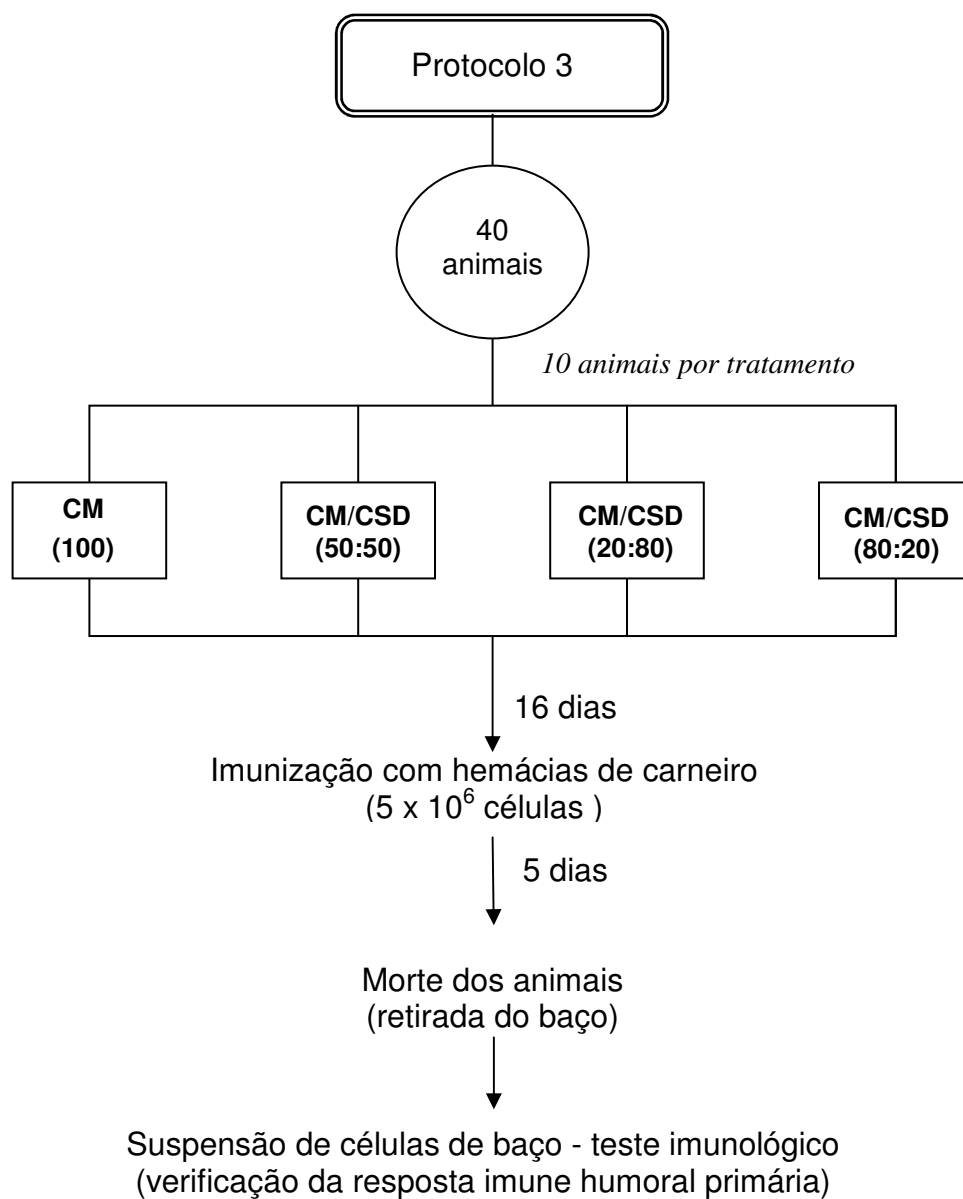


Figura 6 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 20% de proteínas. CM (caseína micelar); CSD (concentrado protéico de soro doce), nas proporções indicadas.

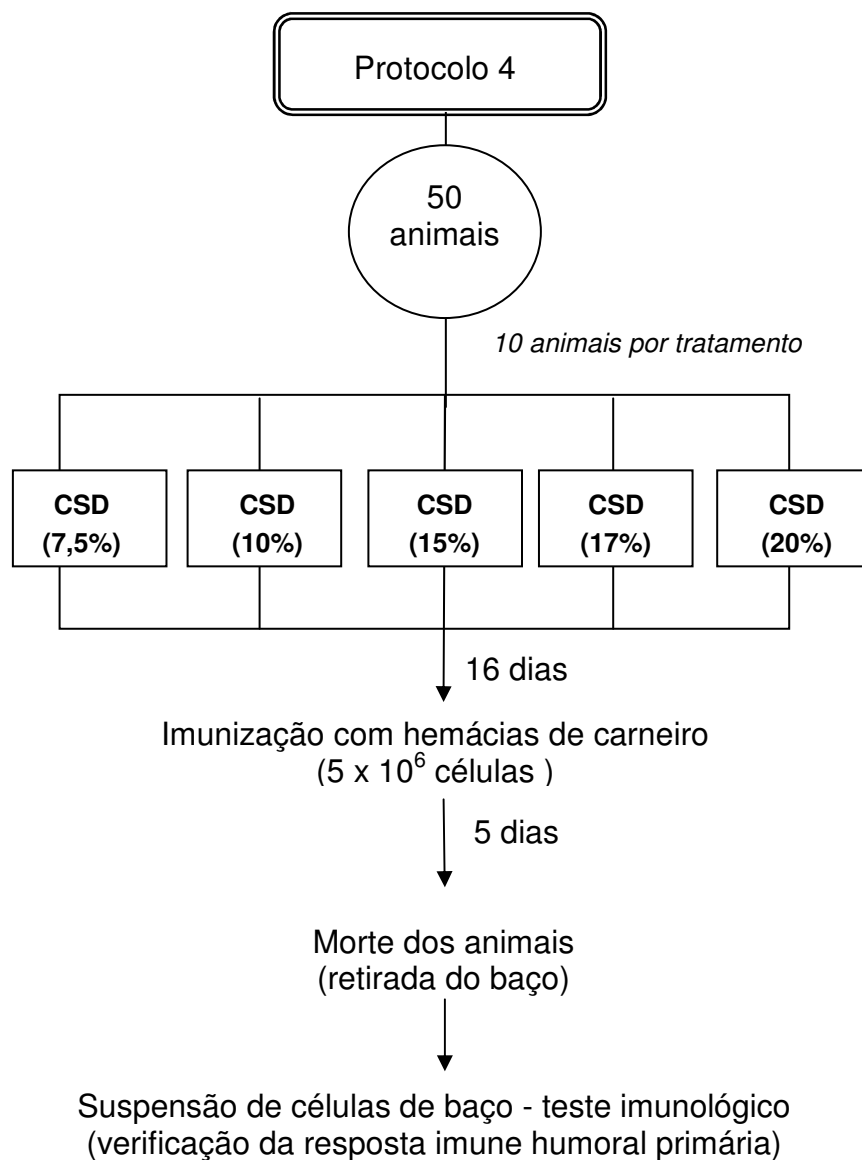


Figura 7 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas formuladas com o CSD (única fonte de proteína) nas seguintes concentrações: 7,5, 10, 15, 17 e 20%.

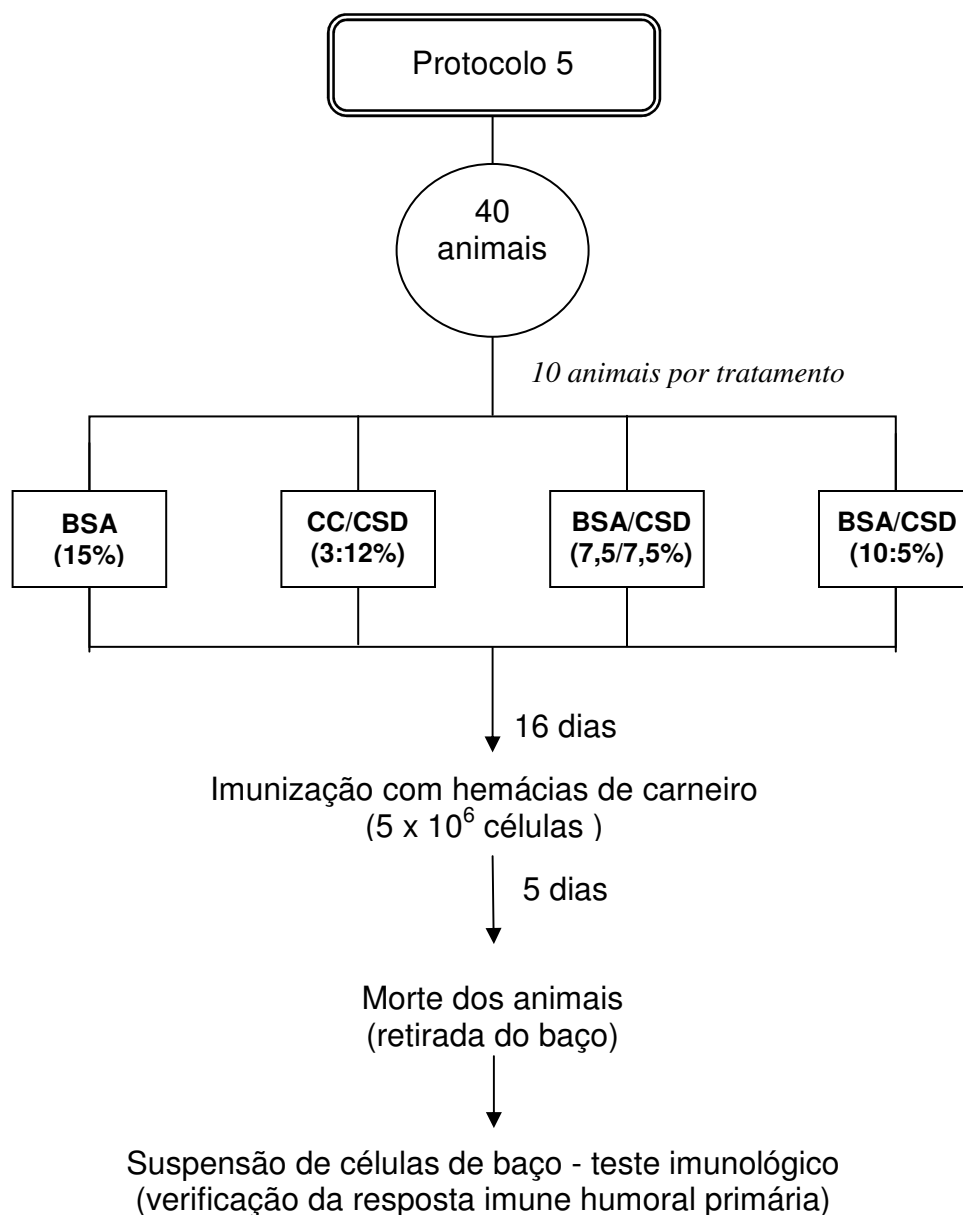


Figura 8 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com misturas de fontes protéicas contendo 15% de proteínas, a saber: BSA (albumina sérica bovina - 15%); CC/CSD (caseína comercial/ concentrado protéico de soro doce - 3:12); BSA/CSD (7,5:7,5) e BSA/CSD (10:5).

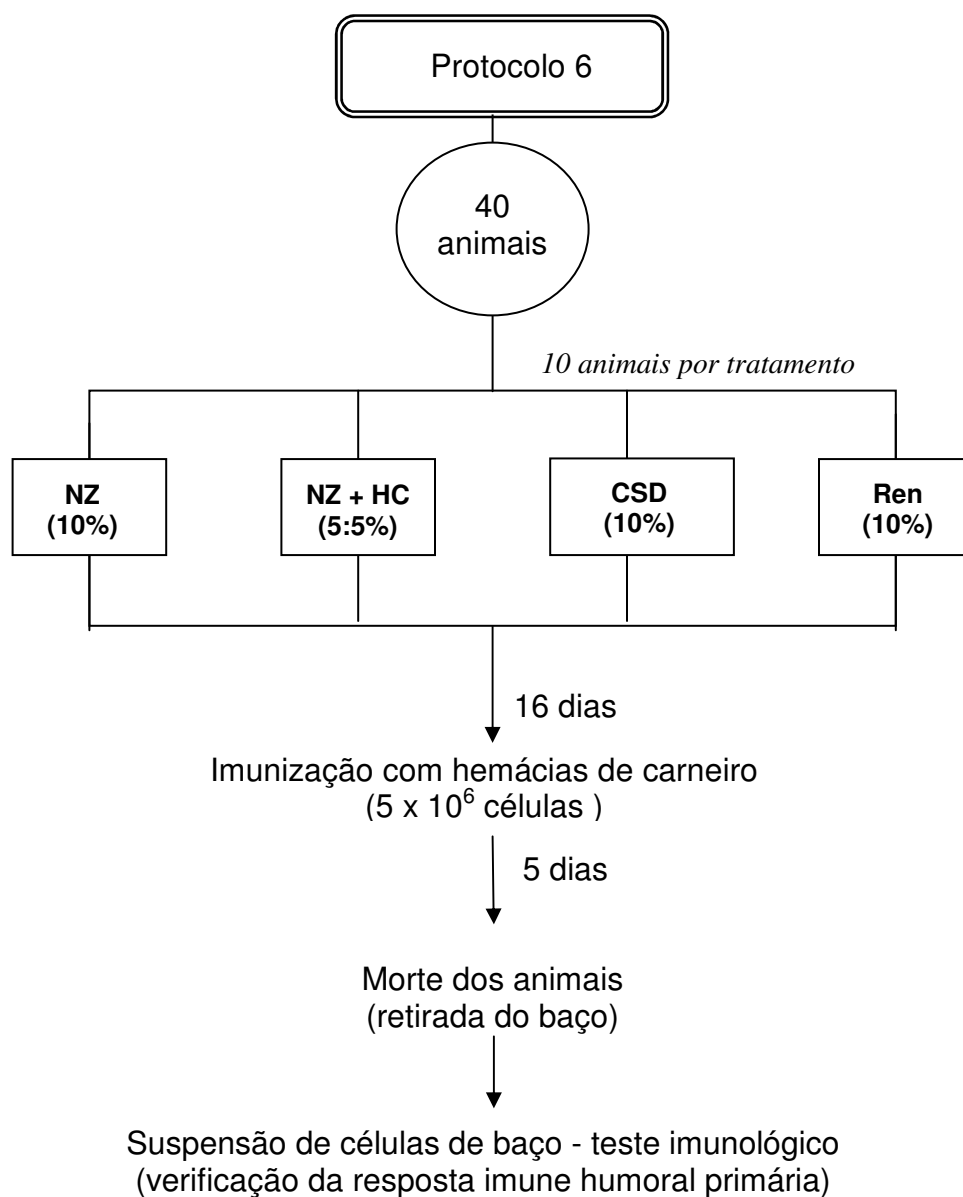


Figura 9 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína das seguintes fontes: NZ (isolado protéico de soro New Zealand 10%); NZ + HC (5% NZ + 5% hidrolisado de colágeno); CSD (concentrado protéico de soro doce 10%); Ren (isolado protéico de soro produzido em Rennes, França - 10%).

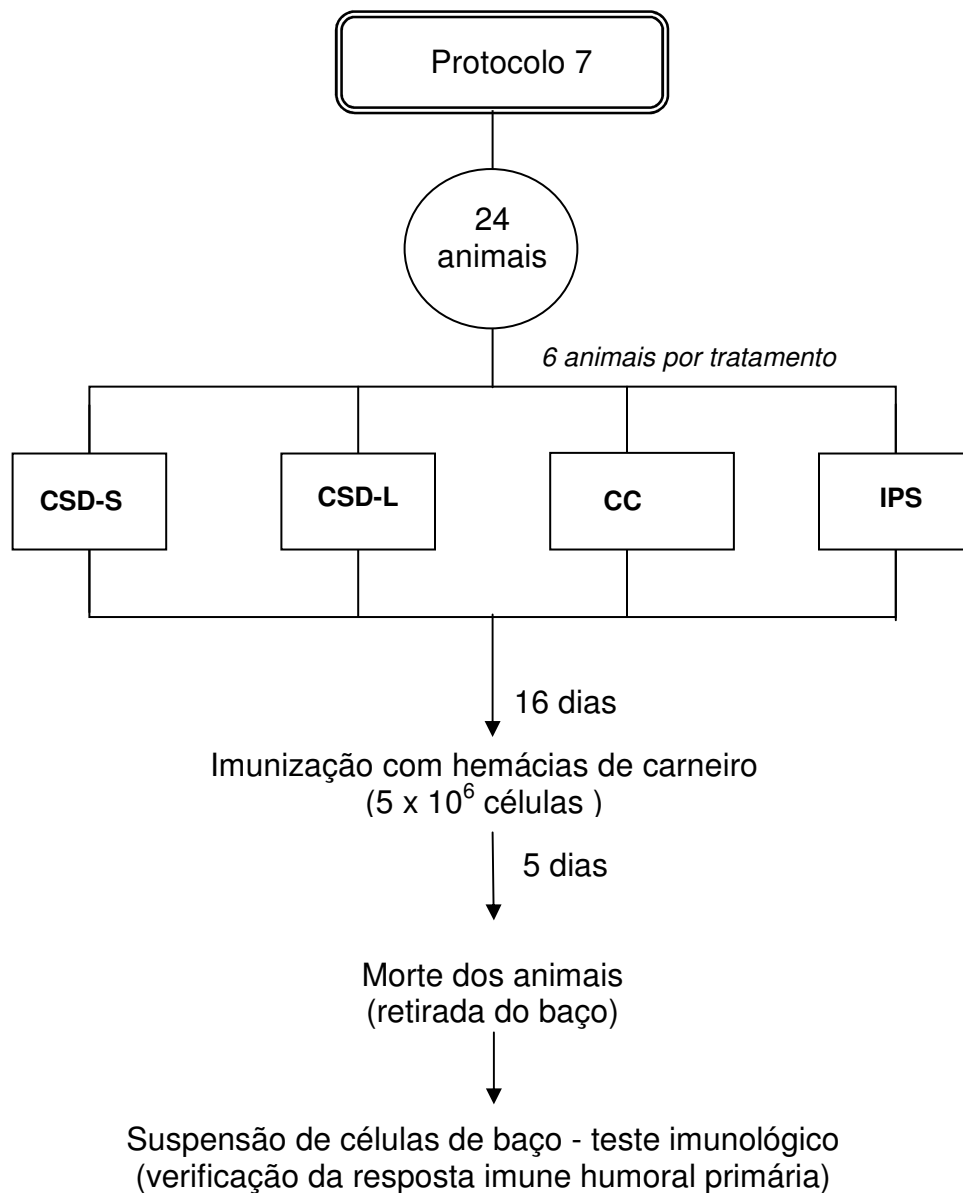


Figura 10 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína das seguintes fontes: CSD-L (concentrado protéico de soro liofilizado); CSD-S (CSD seco em “spray dryer”); CC (caseína comercial) e IPS (isolado protéico de soja).

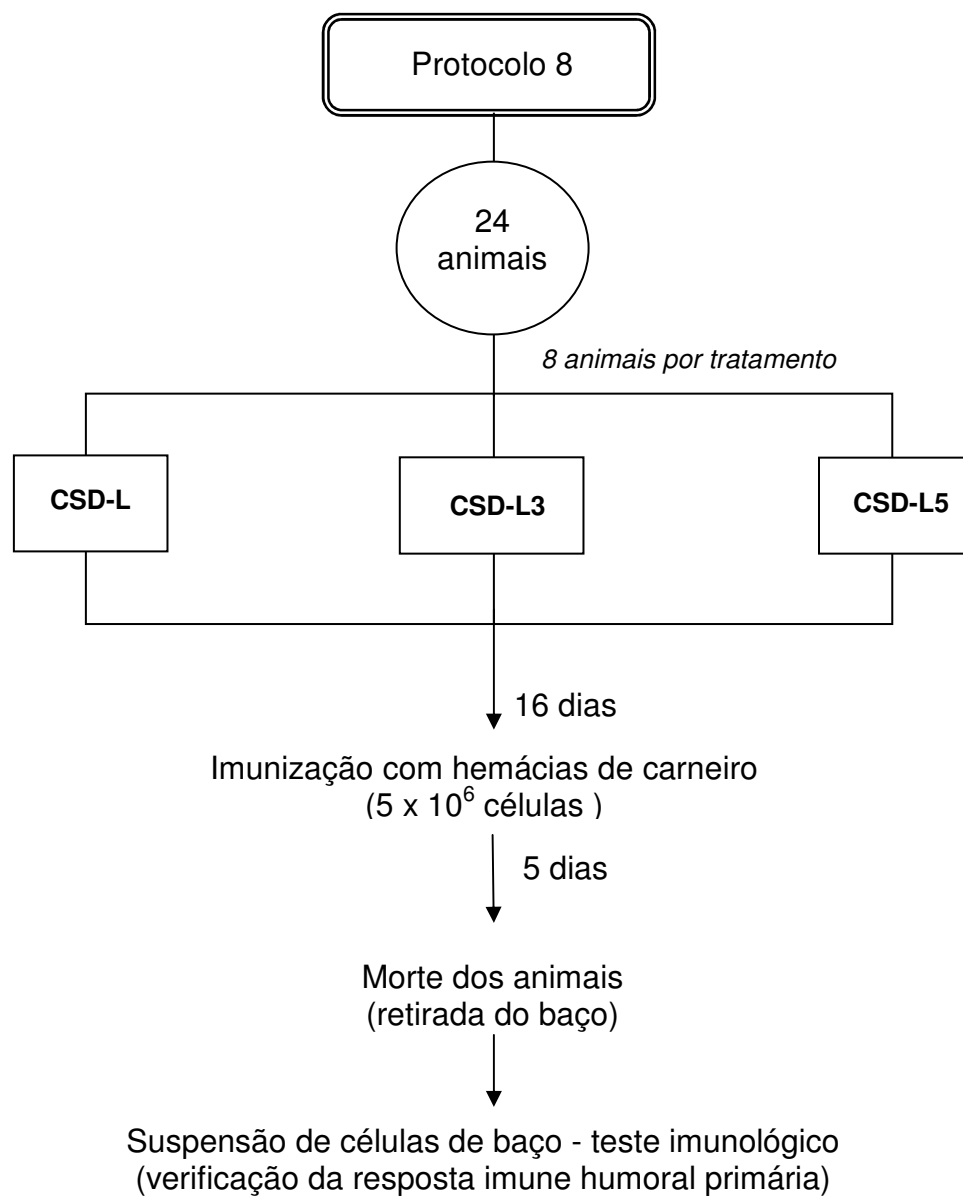


Figura 11 - Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos isogênicos da linhagem A/Uni, recebendo dietas com 20% de proteínas. Tratamentos: CSD-L (concentrado protéico de soro doce liofilizado), CSD-L3 e CSD-L5 (concentrados protéicos liofilizados e irradiados com doses com 3 e 5kGy, respectivamente).

2.3.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa “Statistica 6.0” (Stat Soft Inc, Tulsa, USA). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (GOMES, 1982).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Composição química das fontes protéicas

A composição centesimal aproximada dos concentrados protéicos utilizados nas formulações das dietas encontra-se nas tabelas 1 e tabela 2.

Tabela 1 – Composição centesimal aproximada (média \pm desvio padrão), em base seca, dos concentrados protéicos obtidos do leite bovino.

Componente (base seca)	Fontes protéicas (%)**				
	CSD	CSD-L	CSD-S	CM	CC
Proteínas*	85,69 \pm 4,55 ^a	83,8 \pm 2,6 ^b	82,1 \pm 2,9 ^b	86,14 \pm 0,39 ^a	82,8 \pm 2,70 ^b
Lipídios totais	6,96 \pm 0,17 ^a	4,5 \pm 0,75 ^b	5,4 \pm 1,03 ^a	4,30 \pm 0,06 ^b	1,9 \pm 0,25 ^c
Cinza	2,25 \pm 0,50 ^b	2,8 \pm 0,50 ^b	3,1 \pm 0,56 ^b	8,44 \pm 0,02 ^a	3,5 \pm 0,75 ^b
Carboidratos***	5,10 \pm 0,85 ^b	8,9 \pm 1,6 ^b	9,4 \pm 0,81 ^a	1,12 \pm 0,12 ^c	11,7 \pm 1,96 ^a

*N x fator de conversão 6,38. Determinações feitas em triplicata. **Concentrado protéico de soro de leite bovino (CSD); Concentrado protéico de soro liofilizado (CSD-L); Concentrado protéico de soro desidratado por “spray dryer” (CSD-S); Caseína micelar (CM) e Caseína comercial (CC). ***Determinado como lactose. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Todos os produtos apresentaram concentração de proteína acima de 80%. Quanto aos carboidratos, o maior teor (11,7%) foi verificado na caseína comercial, seguido do concentrado protéico de soro (5%). Os mais baixos teores de cinza foram encontrados no concentrado protéico de soro (2,25%), seguida da caseína comercial (3,5%) e o mais elevado foi da caseína micelar (8,44%). Quanto aos lipídios totais, as mais baixas concentrações foram verificadas com a caseína comercial (1,9%), caseína micelar (4,3%) e no concentrado protéico de soro (6,15%).

Tabela 2 – Composição centesimal aproximada (média \pm desvio padrão), em base seca, das seguintes fontes protéicas: isolado protéico de soja, albumina sérica bovina, globulina sérica bovina, concentrado protéico da Nova Zelândia; hidrolisado de colágeno e isolado protéico de soro - Rennes, França.

Componente (base seca)	Fontes protéicas (%)**					
	IPS	BSA	BSG	NZ	HC	Ren
Proteínas*	92,0 \pm 2,8 ^b	83,35 \pm 0,03 ^e	84,3 \pm 0,09 ^d	86,20 \pm 1,06 ^c	91,0 \pm 0,10 ^b	95,6 \pm 0,21 ^a
Lipídios totais	0,5 \pm 0,03 ^d	4,75 \pm 0,4 ^a	1,69 \pm 0,04 ^c	3,5 \pm 0,02 ^b	0,19 \pm 0,04 ^f	0,87 \pm 0,10 ^d
Cinza	4,0 \pm 0,71 ^a	0,64 \pm 0,03 ^c	0,39 \pm 0,01 ^d	1,86 \pm 0,29 ^b	0,39 \pm 0,19 ^d	2,11 \pm 0,10 ^b
Carboidratos***	3,5 \pm 0,58 ^d	10,62 \pm 1,46 ^{ab}	13,62 \pm 2,87 ^a	8,44 \pm 1,56 ^{bc}	7,42 \pm 1,34 ^c	1,43 \pm 0,18 ^e

*N x fator de conversão: 6,38 para proteínas lácteas (NZ e Ren); 5,71 para soja (IPS) e 5,55 para hidrolisado de colágeno (HC). Determinações feitas em triplicata. **Isolado protéico de soja (IPS); Albumina de soro bovino (BSA); BSG (Globulina de soro bovino); concentrado protéico da Nova Zelândia (NZ); hidrolisado de colágeno (HC) e isolado protéico de soro - Rennes, França (Ren). ***Valores obtidos por diferença. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Todas as fontes protéicas apresentaram concentração de proteína acima de 80%. Quanto aos carboidratos, o maior teor (13,62%) verificado na globulina sérica bovina, seguido da albumina sérica bovina (10,62%). Os teores mais baixos de cinza foram encontrados no hidrolisado de colágeno (0,39%) e globulina sérica

bovina (0,39%), seguida da albumina sérica bovina (0,64%), enquanto o isolado protéico de soja apresentou o valor mais alto (4,0%). Quanto aos lipídios totais, as mais baixas concentrações foram verificadas no hidrolisado de colágeno (0,19%), isolado protéico de soja (0,5%), isolado protéico de soro (Ren) (0,87%) e globulina sérica bovina (1,69%) e os maiores valores apresentados na albumina sérica bovina (4,75%) e concentrado protéico da Nova Zelândia (3,5%).

2.4.2 Efeito imunomodulador

A figura 12 apresenta os resultados de ensaio para verificação do efeito imunomodulador de dietas contendo 20g de proteína/100g de dieta, vindas de fontes diferentes de leite bovino e soja (Protocolo 1, Fig. 4). Os resultados obtidos nessa pesquisa estão de acordo com outros descritos na literatura, ficando evidente o maior efeito imunomodulador exercido pelas proteínas de soro de leite, comparando as diferentes formas de caseína e a proteína de soja. Embora se observe uma tendência de decréscimo entre as fontes IPS, CC e CM, não houve diferença estatística entre elas ($p > 0,05$), embora, as proteínas de soja (IPS) e as duas preparações de caseína (CC e CM) se apresentassem em forma estrutural e molecular bastante diferentes. A composição de aminoácidos dessas fontes protéicas é também bastante diferente, conforme resultados de análises apresentadas no capítulo 3.

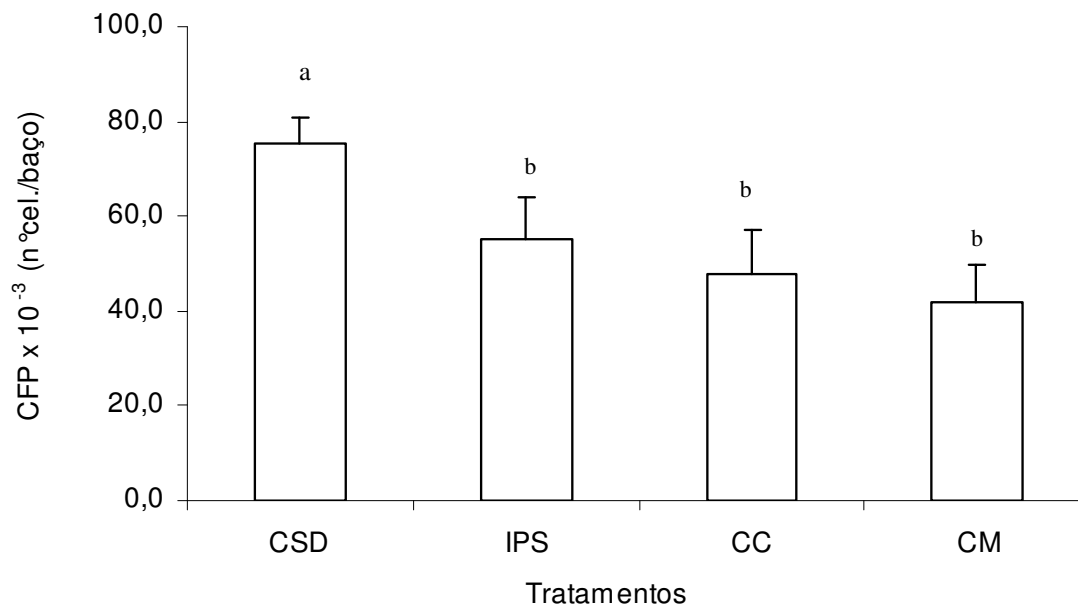


Figura 12 – Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce, produzido no ITAL); IPS (isolado protéico de soja); CC (caseína comercial) e CM (caseína micelar).

Bounous (2000) afirmou que a resposta imune humoral envolvida na produção de anticorpos requer rápida síntese protéica que, por sua vez, requer ingestão dietética adequada de aminoácidos essenciais encontrados nas proteínas de soro de leite.

As proteínas do soro são facilmente digeridas e absorvidas, estimulando a síntese protéica e a proteólise nos tecidos. Ao contrário, quando as caseínas são digeridas, os aminoácidos são absorvidos mais lentamente, promovendo menor síntese protéica nos tecidos e retardando o catabolismo protéico, o que contribui para a conservação de proteína corporal (BARÓ et al., 1995; BRINK, 1996).

As proteínas do soro atuam no metabolismo estimulando a função imune e retardando o processo de envelhecimento. Esses processos parecem ser mediados pela glutatona e existe alta correlação entre a síntese de glutatona e

estimulo imune. A glutathione hepática desempenha um papel crítico na desintoxicação de espécies reativas do metabolismo oxidativo, incluindo aqueles gerados por moléculas endógenas, estresse metabólico, drogas ou carcinógenos. Quando os níveis de glutathione hepática estão baixos, tanto em animais quanto em humanos, há maior suscetibilidade ao dano tecidual causado por metabólitos tóxicos e compostos geradores de radicais livres (BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989; GILL; RUTHERFORD, 1998).

Algumas características do perfil de aminoácidos do CSD tornam a sua utilização importante em várias situações. O alto conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada, particularmente a leucina, parece importante para a regeneração dos tecidos em traumas múltiplos e queimaduras (BRENAN et al., 1986; GILL; RUTHERFORD, 1998).

Os resultados do segundo experimento (Protocolo 2, Fig. 5) estão apresentados na figura 13. A mistura de outras fontes protéicas com o concentrado protéico de soro produziu resultados diferentes. A mistura do CSD com a albumina sérica bovina (CSD/BSA) ou com a lactoferrina (CSD/Lf) apresentou resultado estatisticamente igual àquele verificado com a dieta onde o CSD foi utilizado como única fonte protéica. Quando misturado com outras fontes como globulina sérica bovina (BSG), IPS e CC, verificou-se diminuição do efeito imunomodulador.

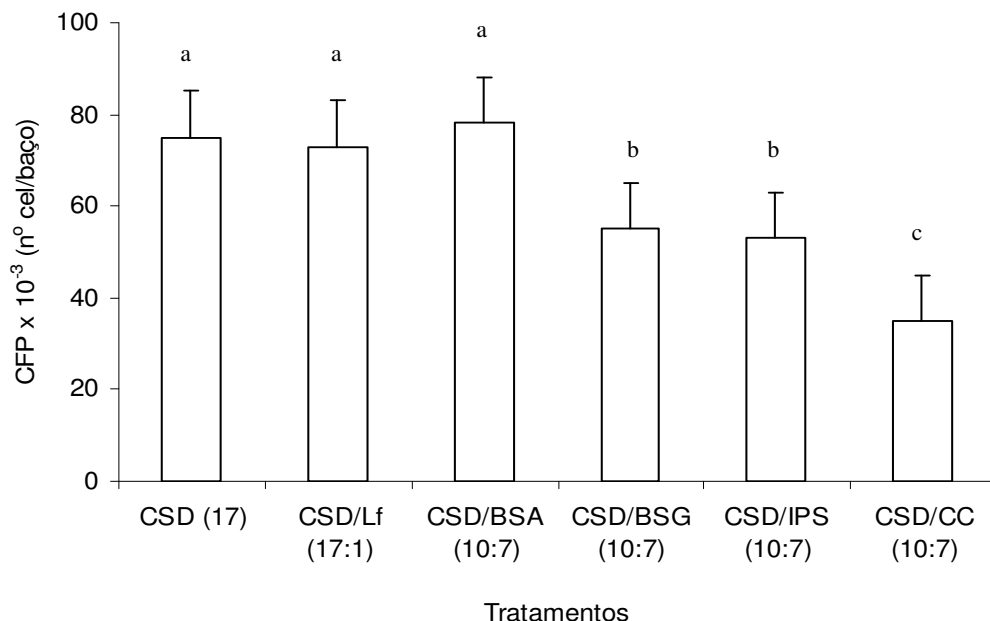


Figura 13 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 17% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce, produzido no ITAL); misturas com 10% de CSD e 7% da proteína BSA (albumina de soro bovino), BSG (globulina sérica bovina), IPS (isolado protéico de soja) e CC (caseína comercial); CSD/Lf (17:1), concentrado protéico de soro doce/lactoferrina (17/1%).

A mistura de lactoferrina (1%) com o CSD (17%) não favoreceu a resposta imune humoral neste ensaio. É interessante notar que a BSA (extraída do soro de sangue bovino) não influiu desfavoravelmente na imunoestimulação do CSD, enquanto que a mesma proporção de globulina de soro bovino (BSG), o IPS e, particularmente, a CC influíram negativamente ($p < 0,05$). Isto se explica pelo fato da BSA de soro bovino ser estrutural e imunologicamente muito semelhante à do soro de sangue humano e que é a mesma encontrada no leite bovino. Portanto existe maior compatibilidade imunológica da BSA (bovina) com o CSD do que as outras proteínas testadas. Trabalhos pioneiros de Bounous e colaboradores no

Canadá mostraram pela primeira vez a relação entre proteínas de soro não desnaturada (ImmunocalTM), elevação dos níveis de glutathione (GSH) em vários tecidos (fígado, baço) e produção de imunoglobulina M (IgM) no baço (BOUNOUS; GOLD, 1991; BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989). Esses pesquisadores demonstraram que alimentando animais com um WPC desenvolvido e patenteado por eles (Imunocal), havia grande produção de GSH em linfócitos de camundongos. Quando esses linfócitos foram isolados dos animais e cultivados “in vitro” retinham a habilidade de promover maior estímulo imunológico. Subseqüentemente mostraram que o poder imunoestimulante do soro de leite dependia, principalmente, da concentração das proteínas termolábeis BSA, α -lactalbumina (α -La) e lactoferrina (Lf). Quando não desnaturadas essas proteínas apresentam basicamente o mesmo número de resíduos de cistina para igual fração de massa molecular.

A BSA apresenta 17 resíduos de cistina (MM 66KDa) e 6 seqüências Glu-(Cys)₂ (BEAULIEU; DUPONT; LEMIEUX, 2006), a Lf com 17 resíduos de cistina (MM 77 KDa) e 4 seqüências Glu-(Cys)₂ (GODMAN; SCHANBACHEIR, 1991) e α -La com 4 resíduos de cistina (MM 14 KDa). Por outro lado a β -lactoglobulina (β -Lg) possui 2 resíduos de cistina (MM 18,4 KDa) e a imunoglobulina G1 (IgG₁) predominante no leite bovino, apresenta 2 pontes dissulfeto com a seqüência Glu-(Cys)₂ (MM 166KDa). Ainda segundo Bounous e Gold (1991), os peptídios contendo a seqüência Glu-(Cys)₂, liberam na digestão e metabolismo 2 dipeptídios glutamil-cisteína (Glu-Cys), que seriam substrato preferido para a síntese intracelular da glutathione. Esse dipeptídio pode facilmente penetrar o interior das células e servir de substrato para a enzima glutathione sintetase. Devido a essa semelhança de estrutura primária e composição aminoacídica, a BSA e a Lf mostraram atividade imunológica perfeitamente compatível com CSD, do qual participam da composição.

O papel tradicional das proteínas de soro em alimentos consiste em fornecer nitrogênio e aminoácidos quando incorporados em uma fonte alimentar. Existem também evidências consistentes na literatura de outros papéis biológicos

exercidos por estas proteínas obtidos de ensaios “in vivo” e “in vitro” (GERMAN; DILLARD; WALZEM, 2001).

A figura 14 apresenta os resultados dos ensaios efetuados para verificar o efeito imunomodulador exercido pelas duas frações protéicas mais representativas do leite bovino quando introduzidas nas dietas em diferentes proporções (Protocolo 3, Fig. 6)

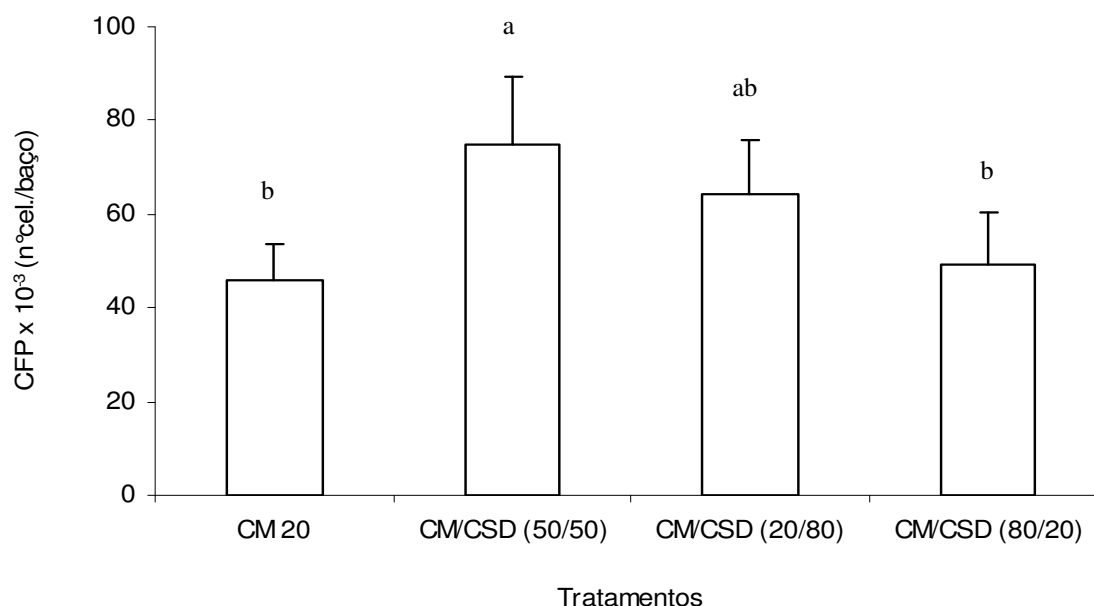


Figura 14 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteínas, a saber: CM (caseína micelar); CM/CSD (50:50); CM/CSD (20:80) e CM/CSD (80:20).

De acordo com a figura 14, as respostas verificadas para imunidade humoral com animais alimentados com a mistura CM/CSD nas proporções de 20:80 e 50:50, não diferiram estatisticamente. Com o aumento da proporção de CM na mistura verificou-se queda dos valores para a resposta imune, o que não

diferiu daqueles verificados com o grupo alimentado com a CM utilizada como única fonte protéica.

Sabe-se que o leite da maioria das espécies de mamíferos difere do leite humano sob vários aspectos, inclusive por apresentarem maiores concentrações de proteínas totais e de caseínas e menor concentração de proteínas de soro. As proteínas do leite humano são diferentes estrutural e qualitativamente das do leite de vaca. No leite humano, 80% do conteúdo protéico é encontrado na fração soro. No leite de vaca esta mesma proporção é de caseína. A relação caseína/proteína de soro no leite humano é de 20/80, a do leite bovino é 80/20. O leite humano apresenta baixa concentração de proteína total e elevada proporção de proteínas do soro, características que são associadas ao crescimento lento e à dilatada longevidade da espécie humana (BOS; GAUDICHON; TOMÉ, 2000; DIAS, 2004).

As proporções entre caseína micelar (CM) e CSD da Figura 14 foram usadas numa tentativa de mostrar como a relação caseína/proteínas de soro poderia influir na estimulação imune em células do baço de camundongo. Utilizou-se caseína micelar por ser mais próxima da caseína encontrada no leite natural. A relação CM/CSD (80:20) imita a composição protéica do leite de vaca, enquanto que CM/CSD (20/80) estaria imitando o leite humano. Pode-se verificar que embora com resultados numericamente diferentes as duas fórmulas protéicas não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Por outro lado, a relação CM/CSD (20:80) não diferiu ($p > 0,05$) de (50:50). É também interessante observar que CM (100%) não diferiu ($p > 0,05$) da fórmula CM/CSD (80:20), sugerindo uma certa incompatibilidade na imunidade humoral entre caseína e proteínas do soro.

Esses resultados sugerem que a produção de uma fórmula protéica semelhante à do leite humano (humanizada) a partir das frações caseína e proteínas de soro através de simples mistura das frações CM e CSD, não produz os resultados esperados, devido às diferenças de composição protéica entre os dois tipos de leite. O leite humano praticamente não contém caseínas do grupo alfa (α -caseínas) possuindo apenas β -caseína que parece ser mais imunoestimulante que as α -caseínas. Por outro lado, o soro de leite humano não

contém β -Lg (predominante no leite bovino), predominando no leite humano a α -La e outros componentes menores, mais imunoestimulantes.

O leite humano é rico em leucócitos e anticorpos que protegem o bebê contra infecções e alergias e possui fatores de crescimento que aceleram a maturação intestinal, também prevenindo alergias e intolerâncias. Um estudo na Suécia sobre a ação da caseína dos leites humanos e de vaca, demonstrou que a caseína presente no leite humano é um dos componentes que ajuda a proteger as crianças contra infecções gastrintestinais, impedindo a adesão de bactérias patogênicas como a *H. pylori* às células da mucosa intestinal humana, enquanto o mesmo não ocorreu com a caseína do leite de vaca (STROMGVIST et al., 1995).

A resposta imune humoral às proteínas do leite não está relacionada apenas com a idade de introdução do complemento de leite, mas também com o consumo de leite na primeira infância (AKERBLON; VAARALA, 1997). Virtanen e col. (1998) observaram em seu estudo que o elevado consumo de leite (de vaca) na infância (mais do que três copos/dia) foi associado com uma maior emergência de auto-anticorpos do que o baixo consumo (menos do que três copos/dia).

Na figura 15 podem ser observados os resultados dos testes imunológicos efetuados com concentrações variáveis de CSD nas dietas (Protocolo 4, Fig. 7). Observa-se que não houve diferença ($p > 0,05$) na imunoestimulação do CSD, na faixa de concentração 10 a 20% de CSD na dieta. Surpreendentemente, a imunoestimulação foi significativamente superior ($p < 0,05$) com a menor concentração de CSD (7,5%) na dieta, como única fonte de proteína. Esta última corresponde à concentração de utilização biológica da proteína, sendo mais eficiente do ponto de vista da utilização metabólica. Ela está próxima da concentração protéica indicada para manutenção, quando o animal não irá ganhar nem perder peso. Dessa maneira, não há necessidade de utilizar uma concentração protéica mais alta para se conseguir uma melhor resposta imune.

Do ponto de vista puramente nutricional, Ziegler (2006) demonstrou que uma mistura com 60% WPI (isolado protéico de soro) + 40% HC (hidrolisado de colágeno) foi melhor que 100% WPI, mostrando também a importância do sinergismo nutricional entre as proteínas.

A figura 16 apresenta a resposta imune humoral observada com camundongos alimentados com dietas formuladas com 15% de proteína total, sendo avaliado, neste caso, particularmente o efeito de diferentes concentrações de BSA (Protocolo 5, Fig. 8).

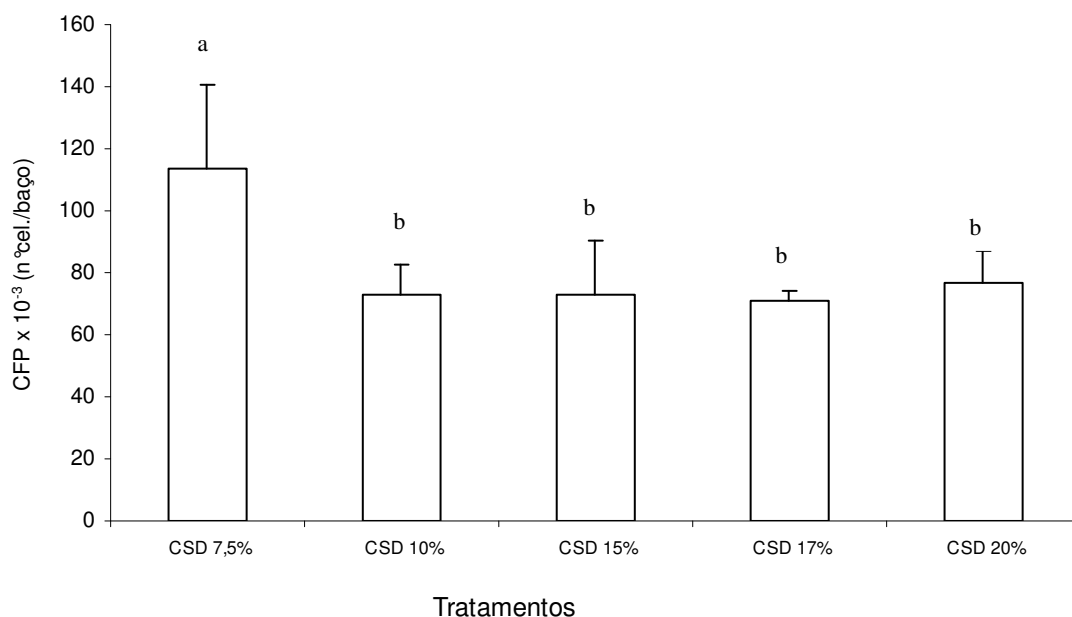


Figura 15 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas formuladas com o concentrado protéico de soro doce, produzido no ITAL (CSD), utilizado em concentrações protéicas diferentes (7,5, 10, 15, 17 e 20%), da dieta.

Essa observação é importante tendo-se em conta que elevadas concentrações de CSD podem representar um desperdício de proteína de alto custo, mas também mascarar efeitos imunomodulatórios e/ou sinérgico que possam ocorrer quando CSD aparece na dieta em misturas com outras proteínas.

Observa-se na figura 13 que na concentração de 17% o CSD aparentemente mascarou um esperado efeito complementar ou sinérgico entre o CSD mais 1% de lactoferrina, sendo o CSD, negativamente afetado ($p < 0,05$) quando em combinação com 7% de BSG, IPS ou CC.

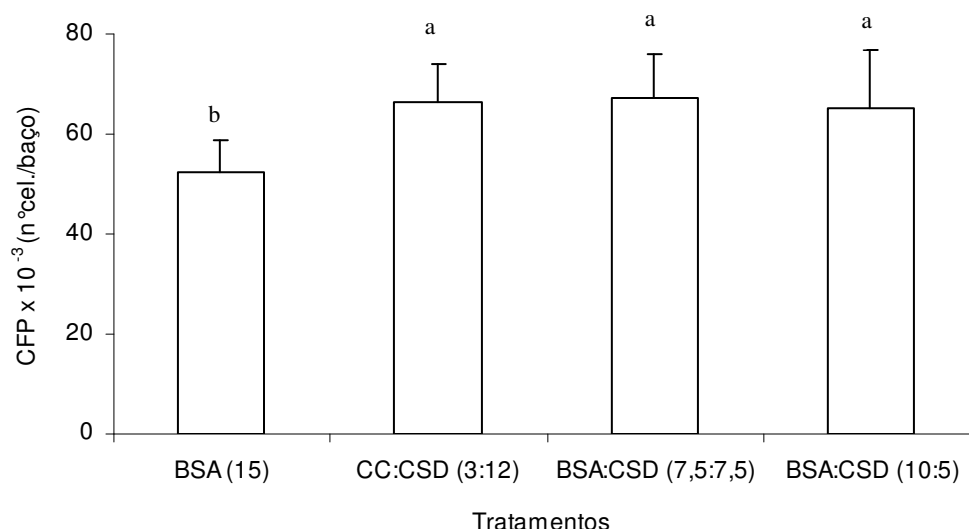


Figura 16 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas formuladas com misturas de fontes protéicas contendo 15% de proteínas, a saber: BSA, albumina sérica bovina; CSD, concentrado protéico de soro doce, produzido no ITAL; CC, caseína comercial.

Pelos dados da Figura 16 é possível observar que a imunoestimulação da dieta BSA (15), 100% BSA foi significativamente inferior à combinação BSA + CSD (50/50%) e BSA + CSD (66,7/33,3%) indicando, mais uma vez, que a BSA é compatível e complementar ao CSD, em termos imunológicos mas inferior ao CSD, quando utilizada como única fonte protéica.

Este resultado poderia ser esperado ao se considerar que a BSA é apenas uma das proteínas consideradas imunoativas no soro de leite, juntamente com a

Lf, a α -La e possivelmente a IgG, atuando de forma cooperativa (BOUNOUS, 1997).

As proteínas do soro de leite possuem a capacidade de aumentar a resposta imune, elevar os níveis de glutathione celular e aumentar a longevidade. Sabe-se que a albumina de soro (BSA) é a mesma para o sangue e para o leite, e que esta seria uma das maiores responsáveis pelo aumento nos níveis de glutathione, associada à melhor resposta imune. Acredita-se que esta capacidade em aumentar a resposta imune e os níveis de glutathione, sugerida para a BSA do soro sanguíneo, depende grandemente dos peptídeos de glutamylcystine formados no processo de digestão da BSA no estado nativo. É muito importante preservar estes peptídeos para manter a integridade da proteína e a sua funcionalidade. Se essas ligações forem rompidas, as proteínas ficam mais expostas às enzimas digestivas que poderão destruir sua especificidade, eliminando suas propriedades fisiológicas (BRINK, 1996).

A figura 17 mostra os resultados de ensaio imunológico com a utilização de concentrados protéicos de soro de diferentes origens e de uma mistura com colágeno hidrolisado, na concentração final de 10% de proteína nas dietas (Protocolo 6, Fig. 9).

Os dois tratamentos que utilizaram concentrados protéicos de soro produzidos em condições que preservaram a integridade protéica (Ren e CSD) produzidos na França e no ITAL/Campinas, respectivamente, promoveram efeitos imunomoduladores similares (média \pm desvio padrão). Já o concentrado protéico de uso comercial (NZ) produzido na Nova Zelândia, utilizado como única fonte protéica exerceu efeito imune inferior ($p < 0,05$), o que denota a importância da origem e a diferença no processo de obtenção do material tendo em vista que fracionamento e/ou desnaturação de proteínas interfere no poder imunoestimulatório. A mistura de HC ao NZ não favoreceu uma melhor resposta e estes dois tratamentos diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

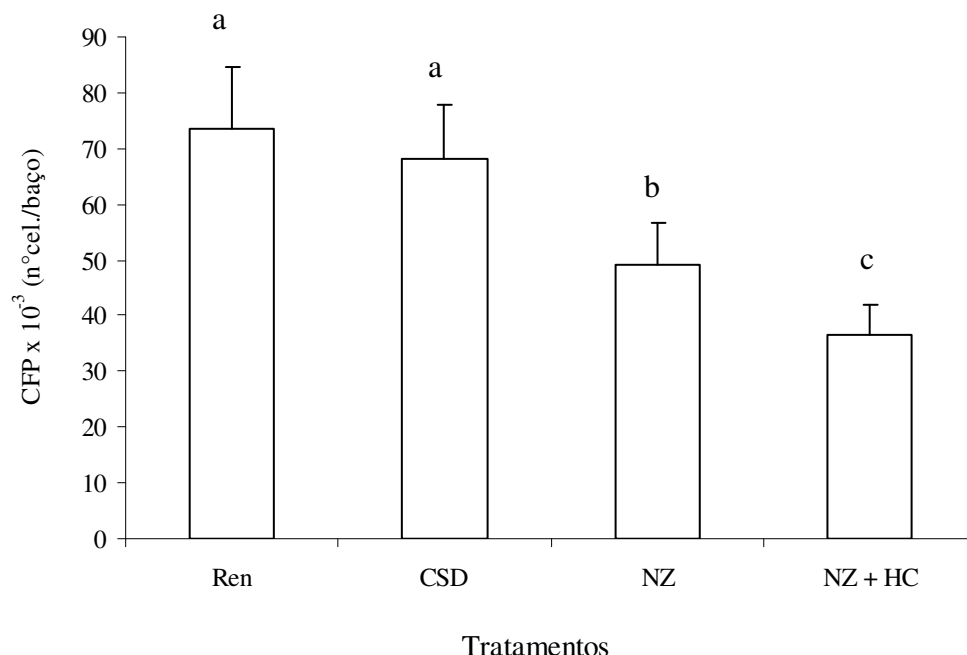


Figura 17 - Resposta imune humoral primária verificada com camundongos machos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 10% de proteínas, a seguir: Ren (isolado protéico de soro doce produzido em Rennes, 10%); CSD (concentrado protéico de soro doce 10%, produzido no ITAL); NZ (isolado protéico de soro New Zealand 10%) e NZ+HC (NZ 5% + hidrolisado de colágeno 5%).

É provável que a diferença fundamental entre o CSD e o isolado protéico (Ren), que não diferiram entre si ($p > 0,05$), para o isolado protéico (NZ) produzido na Nova Zelândia seja a tecnologia utilizada na obtenção desses produtos. O CSD foi produzido por coagulação enzimática da caseína, seguida da ultrafiltração para concentração das proteínas e outros componentes bioativos do soro. Segundo informação do fabricante, o produto NZ foi fabricado com o uso de coluna de troca iônica, que não incluiria as proteínas lactoferrina (Lf) e lactoperoxidase, por apresentar ponto isoelétrico (pI) próximo de 9,0, bem mais alcalino que as demais proteínas. Essas duas proteínas omitidas do produto NZ, embora se apresentem

em concentração muito baixa no soro de leite bovino, são importantes do ponto de vista imunológico.

Na figura 18 (protocolo 7, Fig. 10) procurou-se avaliar os efeitos sobre CSD de dois processos de secagem, liofilização (L) e “spray drying” (S), além de comparar os resultados do teste de CFP desenvolvido utilizando dietas com 20g de proteína/100g de dieta. Do ponto de vista nutricional esses concentrados protéicos foram equivalentes.

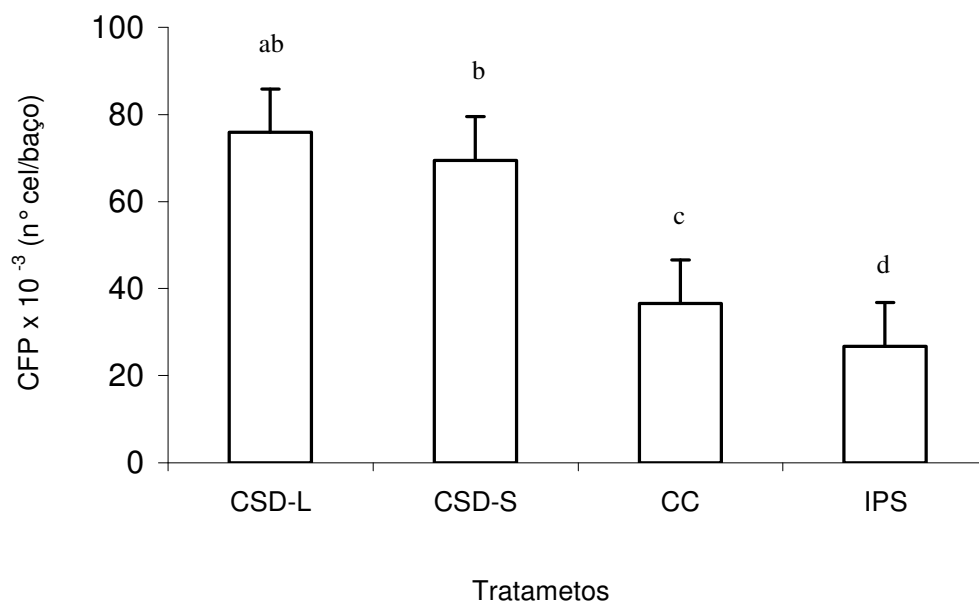


Figura 18 – Resposta imune humoral primária observada em camundongos da linhagem A/Uni alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: CSD-L (concentrado protéico de soro de leite liofilizado); CSD-S (CSD seco em “spray dryer”); CC (caseína comercial) e IPS (isolado protéico de soja). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). CFP (células formadoras de placas/baço).

Os melhores resultados (média \pm desvio padrão) foram obtidos para as dietas contendo proteínas de soro de leite: CSD-L e CSD-S enquanto que CC e o

IPS apresentaram resultados inferiores. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os concentrados protéicos secos por liofilização (CSD-L) e por atomização (CSD-S). Isto provavelmente aconteceu porque a desidratação em “spray” não promoveu desnaturação considerável que pudesse interferir na imunomodulação. Os resultados obtidos estão de acordo com outros da literatura, efetuados com as mesmas fontes protéicas e nas mesmas concentrações de proteínas nas dietas (BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989; DIAS, 2004; DIAS et al., 2006).

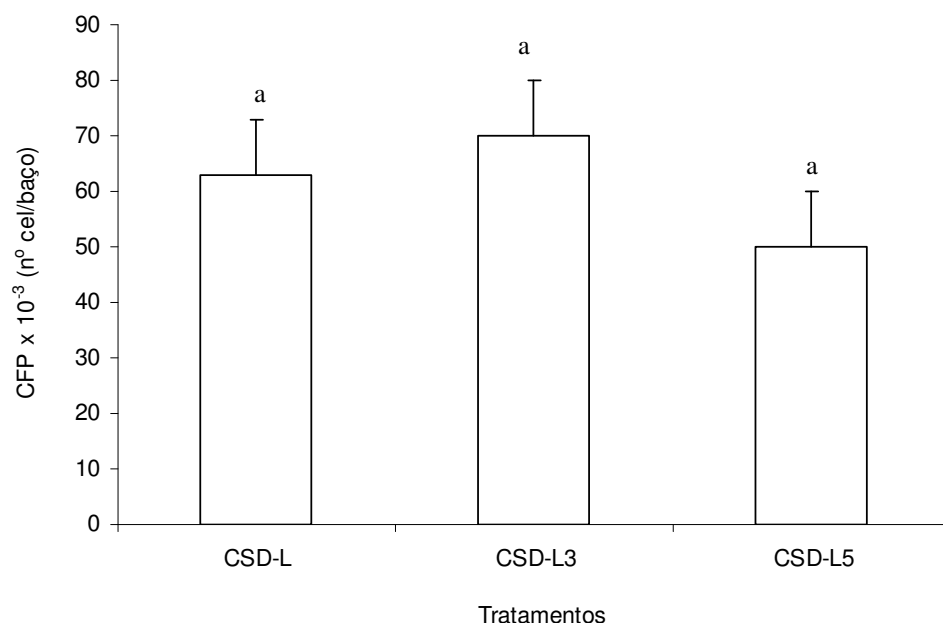


Figura 19 – Resposta imune humoral primária observada em camundongos da linhagem A/Uni alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: CSD-L (concentrado protéico de soro doce liofilizado); CSD-L3 (irradiado com 3kGy) e CSD-L5 (irradiado com 5kGy). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os efeitos de duas doses de irradiação (3 e 5kGy) sobre o perfil de resposta imune anteriormente observado para o concentrado protéico de soro de leite seco por liofilização estão representados na figura 19 (Protocolo 8, Fig. 11). Nesse ensaio também não foram observadas diferenças de ganho de peso dos animais entre os tratamentos ($p > 0,05$), correspondendo a $12,28 \pm 2,46\text{g}$, $13,36 \pm 2,26\text{g}$ e $11,45 \pm 2,73\text{g}$ para CSD-L, CSD-L3 e CSD-L5, respectivamente.

Os melhores valores de resposta imune humoral, medidos por contagem de células formadoras de placas (média \pm desvio padrão), foram obtidos dos animais alimentados com CSD-L e CSD-L3 correspondendo, respectivamente, a 68800 ± 15400 e 71270 ± 12860 CFP/baço. O aumento da dose de irradiação de 3kGy para 5kGy promoveu redução do efeito imunomodulador (50265 ± 8160 CFP/baço), estatisticamente diferente daqueles anteriormente citados ($p < 0,05$).

2.5 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a existência de efeito imunomodulador de dietas contendo concentrado protéico de soro de leite bovino, já reportado em outros trabalhos da literatura. As proteínas de soro foram mais eficientes em modular a resposta imune, quando comparadas à caseína e ao isolado protéico de soja e os concentrados de albumina e de globulinas de soro de sangue bovino. Concentrados protéicos de soro de leite bovino, de diferentes origens e processos de fabricação, diferiram quanto ao poder imunoestimulante após imunização com hemáceas de carneiro (SRBC). O teste com irradiação foi executado pelo fato do processamento do CSD (ITAL) ter ocorrido em planta piloto por processo manual, um tanto artesanal, em ambiente aberto, o que resultou em alguns lotes de proteínas desidratadas (CSD) apresentavam contagem microbiológica um pouco acima do recomendado para produtos lácteos, em pó. Houve interesse de demonstrar que, pelo processo de irradiação gama, poder-se-ia, baixar a contagem microbiológica sem afetar o produto do ponto de vista nutritivo e imunoestimulante. A utilização do CSD em concentração de 7,5% de

proteínas na dieta foi eficiente no efeito imunomodulador, utilizado como única fonte protéica ou misturado à BSA (50:50) em um total de 15g/100g de dieta. A mistura da BSA com CSD (5:10) também exerceu efeito imune importante.

A utilização de irradiação da dieta na dose de 3kGy não afetou o efeito imunomodulador observado para as proteínas de soro além de apresentar efeito antimicrobiano equivalente à pasteurização do leite líquido pelo processo convencional. Pesquisas realizadas, não relatadas neste trabalho, confirmaram dados da literatura de que a desnaturação protéica reduz, significativamente, o efeito imunoestimulador.

2.6 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. 494 p.

ACTON, G. H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 9, n. 3, p. 111-114, 1977.

AKERBLON, H. K.; VAARALA, O. Cow milk proteins, autoimmunity and type 1 diabetes. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, Heidelberg, v. 105, n. 2, p. 83-85, 1997.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemistry**, 15th. ed., Washington DC, 1990. 1141 p.

BARÓ, L.; GUADIX, E. M.; AUGUSTIN, O. M.; BOZA, J. J.; GIL, A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate-based diets. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 68, n. 1, p. 55-61, 1995.

BEAULIEU, J.; DUPONT, C.; LEMIEUX, P. Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. **Thérapie**, Paris, v. 3, n. 1, p. 69-78, 2006.

BEAULIEU, J.; DUPONT, C.; LEMIEUX. Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. **Thérapie**, Paris, v. 3, n. 1, p. 69-78, 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

BOS C.; GAUDICHON, C.; TOMÉ D. Nutritional and physiological criteria in the assessment and milk protein quality for human. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 19, n. 2, p. 191S-205S, 2000.

BOUNOUS, G. **The fascinating story behind a health-promoting product – Patented milk serum (whey) protein concentrate** Immunotec Clinical Foundations. Immunotec Research Ltda. Copyright, 1997. 20 p.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Ulrich, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, 2000.

BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 16, n. 3, p. 204-209, 1993.

BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary protein in mice: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 12, v. 3, p. 154-161, 1989.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

BRENAN, M. F.; CERRA, F.; DALY, J. M.; FISCHER, J. M.; MEDAWER, L. L.; SMITH, R. J.; VINARS, E.; VANNEMACHER, R.; YONG, V. R. Report on a

research workshop: branched-chain amino acids in stress and injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thorofare, v. 10, n. 5, p. 45-52, 1986.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, Scottsdale, p. 21-28, 1996.

CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **British Journal of Nutrition**, London, v. 88 (suppl. 2), p. S165-S176, 2002.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 52, n. 1, p. 77-84, 1993a.

CHANDRA, R. K. Influence of nutritional deficiency in the elderly. In: Cunningham-Rudles, S. (Ed.) **Nutrient modulation of immune response**. New York: Mercel Deker, 1993b. p. 455-468.

CROSS, M. L.; GILL, H. S. Immunomodulatory properties of milk. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84 (suppl. 1), p. S81-S89, 2000.

CUNNINGHAM, A.; SZENBERG, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. **Immunology**, Buenos Aires, v. 14, n. 4, p. 599-600, 1968.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Analytical methods for evaluation of the immune response in nutrient intervention. **Nutrition Review**, Baltimore, v. 56, n. 1, p. S27-S37, 1998.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Malnutrition and gut immune function. **Current Opinion in Gastroenterology**, Philadelphia, v. 10, p. 664-670, 1994.

DIAS, N. F. G. P. **Propriedades imunoestimulatórias e anti-tumoral de concentrados protéicos de soro de leite bovino, de caseína e de um isolado protéico de soja**. Campinas, SP: UNICAMP, 2004. 149p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2004.

DIAS, N. F. G. P.; SGARBIERI, V. C.; JACOBUCCHI, H. B.; RANGEL, H. A.; TANIKAWA, C. Dietary protein, immune function and carcinogenesis in the mouse. **Le Lait**, Lyon, v. 86, n. 3, p. 213-226, 2006.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization on the United Nation/World Health Organization. **Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation**, Bethesda, Maryland, USA, 1990. 66 p.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J.; WALZEM, R. L. U. S. **Whey products and dairy ingredients for health: a review**. Chicago: U. S. Dairy Export Council, 2001.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J. Immunomodulatory properties of bovine milk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, n. 336, p. 31-35, 1998.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J.; CROSS, M. L. Bovine milk: a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In: BUTTRISS, J.; SALTMARSH, M. **Functional foods II** – Claims and evidence. Cambridge: Royal Society of Chemistry Press, 2000. p. 82-90.

GODMAN, R. E.; SCHANBACHER, F. L. Bovine lactoferrin in RNA: Sequence, analysis and expression in the mammary gland. **Biochemical, Biophysical Research Communication**, New York, v. 180, n. 1, p. 75-84, 1991.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 10. ed. São Paulo: Nobel, 1982. 430 p.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 4, p. 74-77, 1994.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia**: o sistema imunológico na saúde e na doença. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 634 p.

LOW, P. P. L.; RUTHERFURD, K. J.; GILL, H. S.; CROSS, M. L. Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in

immunized BALB/C mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 393-401, 2003.

MORENO, Y. M. F. **Influência das proteínas do soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS)**. Campinas, SP. UNICAMP, 2002. Ciência da Nutrição, 105 p. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

MORENO, Y. M. F.; SGARBIERI, V. C.; SILVA, M. N.; TORO, A.; VILELA, M. N. Features of whey protein supplementation in children with rapidly progressive HIV infection. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 52, n. 1, p. 34-38, 2005.

PRATA, A. S. **Proteínas de soro de sangue bovino: propriedades nutritivas e funcionais** (Dissertação de Mestrado). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 162 p.

PRINDULL, G.; AHMAD, M. The ontogeny of the gut mucosal immune system and the susceptibility to infection in infants of developing countries. **European Journal of Pediatrics**, San Diego, v. 152, n. 10, p. 786-792, 1993.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROMAN, J. A. **Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da caseína de leite bovino obtida por diferentes processos**. Campinas, SP: UNICAMP, 2002, p. 176. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SAVILLE, B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. **Analyst**, Cambridge, v. 83, n. 2, p. 670-672, 1958.

SPACKMAN, D. C.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of amino acids. **Biochemistry**, New York, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

SPIES, J. R. Determination of tryptofan in proteins. **Analytical Chemistry**, Arlington, v. 39, n. 12, p. 1412-1415, 1967.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 689 p.

STRONGIST, M.; FALK, P.; BERSTROM, S.; HANSON, L.; LONNERDAL, B.; NORMARK, S.; HERNELL, O. Human milk k-casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 228-298, 1995.

WONG, C. W.; WATSON, D. L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 62, n. 2, p. 359-368, 1995.

WOODWARD, B. Morphometric and functional studies of the thymus and production of cytokines in protein-energy malnutrition. In: YOUNG, K. W.; CHA, L. Y.; YULL, L. K.; SOON, J. J.; HE, K. S. (Eds.) **Proceedings of the XIV International Congress of Nutrition**, Seoul: International Union of Nutrition Science, 1998. p. 281-284.

ZIEGLER, F. L. F. **Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos**. Campinas, SP: UNICAMP, 2006, p. 197. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2006.

CAPÍTULO 3

DIGESTÃO, ABSORÇÃO E ESTÍMULO À SÍNTESE TECIDUAL DE GLUTATIONA DE UM CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE E DA CASEÍNA, NA FORMA ÍNTEGRA E HIDROLISADA

RESUMO

Os experimentos realizados neste capítulo tiveram como principais objetivos: 1. Comparar o poder de estímulo à síntese hepática de glutathione (GSH) de uma caseína comercial íntegra (não hidrolisada) e dois hidrolisados caseínicos produzidos a partir de material protéico e processos diferentes. 2. Efetuar a avaliação nutricional da caseína íntegra e de seus hidrolisados. Um hidrolisado (Hidrol, 30% GH) produzido em laboratório pela ação da protease flavourzyme (Novo Nordisk) e outro hidrolisado (Hyprol, 20% GH) importado da Holanda, cuja enzima e processo de hidrólise empregados não foram revelados pelo fabricante. Os materiais protéicos foram utilizados para preparação de dietas indicadas para ratos em crescimento (AIN-93G), cujo componente protéico foi modificado para 12% (12g/100g de dieta) das seguintes fontes: a) dieta CSD = concentrado de soro doce produzido em planta piloto (ITAL); Hidrol = hidrolisado de caseína comercial (CC) produzido no ITAL, Campinas; Hyprol = hidrolisado de caseína comercial importado da Holanda; CC = caseína comercial (M Cassab, SP). Os resultados confirmaram a superioridade das proteínas do CSD, quanto ao estímulo à síntese hepática de glutathione (GSH). O Hidrol foi o hidrolisado com menor poder de síntese de GSH no 25º dia de experimento. O hidrolisado Hyprol e a CC mostraram a mesma capacidade de estimular a síntese hepática de GSH. Quanto aos índices nutricionais, não se observaram diferenças entre os tratamentos CSD, CC, Hyprol e Hidrol, para o desenvolvimento corpóreo (crescimento), aspectos gerais dos animais e quociente de eficiência protéica (PER). Concluiu-se pela

superioridade funcional do CSD (síntese de GSH) e igualdade dos concentrados protéicos utilizados quanto ao valor nutritivo.

3.1 INTRODUÇÃO

Nas décadas de 1980/90, Gustavo Bounous e colaboradores (BOUNOUS et al., 1983; 1985; 1989; 1991) publicaram uma série de artigos enfatizando a capacidade das proteínas do soro de leite bovino estimular as células de baço, em várias linhagens de camundongo, a produzirem imunoglobulina do grupo M (IgM), quando estimulados por injeção intravenosa de hemáceas de carneiro. O poder imunoestimulatório das proteínas do soro de leite (WPC) mostrou-se várias vezes superior que o da caseína, da soja, das proteínas do trigo e das proteínas da dieta comercial produzida pela Purina. Além da maior produção de IgM no baço, as proteínas do soro foram também superiores às demais proteínas nas respostas à presença de mitógenos, como a fitohemaglutinina (PHA) ou concanavalina A (Con A).

Essa preparação de proteínas de soro de leite, na forma concentrada, foi mais tarde (BOUNOUS, 1997) patenteada com a denominação de IMMUNOCALTM. Outros pesquisadores, em outros países pesquisaram intensamente, além da propriedade imunoestimulante outras propriedades biológicas de grande interesse para a saúde, tais como: antitumoral (BOUNOUS et al., 1988; McINTOSH et al., 1995; DIAS et al., 2006); antiviral (MORENO et al., 2005; WATANABE et al., 2000; MIKE et al., 2002); antiulcerogênica (ROSANELI et al., 2002, 2004; MEZZAROBÀ et al., 2006).

Os dados da literatura mostram que as propriedades imunomoduladoras e outras propriedades funcionais fisiológicas das proteínas do soro de leite bovino (WPC, WPI) se manifestam em sua máxima potencialidade, enquanto as características estruturais das proteínas termolábeis do soro forem mantidas. A desnaturação térmica e outros processamentos drásticos prejudicam sensivelmente suas propriedades que, segundo o grupo canadense (BOUNOUS, 1997), dependem da preservação das ligações dissulfeto (Cys-Cys) intactas e da

sequência ácido glutâmico-cistina Glu-(Cys)₂, que ocorrem nas estruturas primárias de algumas das proteínas do soro.

As propriedades funcionais fisiológicas das proteínas do soro de leite dependeriam basicamente da liberação, na hidrólise enzimática, de peptídios contendo a sequência Glu-(Cys)₂ que, no processo de absorção e metabolismo, formariam glutamil-cisteína, substrato da enzima glutathione sintetase, a glutamil-cisteinil-glicina (BOUNOUS; GOLD, 1991).

O fato das proteínas do soro de leite estimularem a síntese intracelular de glutathione (GSH) e de que a inibição da síntese de GSH pelo composto sulfoximina de butationina (BSO) inibe também a produção de imunoglobulina por essas proteínas, permitiu a conclusão de que a GSH deva estar associada à imunomodulação, e suportar a hipótese de que o estímulo à síntese da GSH depende da riqueza em grupos S-S das proteínas do soro e, possivelmente, da formação de peptídios Glu-Cys, nos processos de digestão, absorção e metabolismo.

Embora o aminoácido cisteína seja um fator limitante para a síntese da GSH, a cisteína livre fornecida na dieta não representa substrato ideal para a síntese enzimática da GSH por ser tóxica e oxidar-se espontaneamente (MEISTER, 1994).

Com base nos argumentos aqui expostos as pesquisas visando buscar peptídios biologicamente ativos, nos hidrolisados enzimáticos, foram recentemente intensificadas.

As características de composição, propriedades físico-químicas e funcionais (tanto as de interesse tecnológico como bioquímico e fisiológico) e também as propriedades sensoriais de hidrolisados protéicos enzimáticos estarão na dependência de vários fatores, sendo os mais importantes: natureza química e estrutural da proteína, natureza e intensidade dos processos a que tenha sido submetida, condições da hidrólise e especificidade da enzima proteolítica e finalmente o grau de hidrólise.

Os critérios mais importantes a serem considerados na produção de hidrolisados protéicos incluem valor nutricional, custo, sabor, antigenicidade e

funcionalidade. As proteínas mais utilizadas para este propósito são as caseínas, as proteínas do soro de leite e as de soja. Entre as enzimas (proteases) têm sido usadas as do sistema digestivo (pancreatina, pepsina, α -quimotripsina), algumas de origem vegetal como papaína e várias enzimas de origem microbiana (LAHL; BRAUN, 1994). Preparações enzimáticas de origem microbiana, comumente misturas de várias enzimas também são empregadas (CASTRO et al., 1996; ANDERSON et al., 2008).

Hidrolisados protéicos enzimáticos constituem fontes protéicas adequadas para a nutrição humana devido à sua alta absorção, mais efetiva que a proteína intacta ou aminoácidos livres (SIEMENSMA; WEIJER; BAK, 1993). Por isso são muito utilizados em formulações específicas com o objetivo de melhorar características nutricionais e funcionais (MAHMOUD, 1994), incluindo fórmulas infantis hipoalergênicas, preparações imunoestimulantes, produtos geriátricos, dietas terapêuticas e bebidas esportivas (FROKJAER; 1994).

Para o tratamento clínico de pacientes que apresentam complicações gastrointestinais, desnutrição decorrente de processos tumorais, queimaduras ou outros traumas, diarreia aguda ou crônica, alergias alimentares ou desordens no metabolismo de aminoácidos, como na fenilcetonúria, são utilizadas fórmulas sintéticas constituídas de misturas de aminoácidos livres ou hidrolisados protéicos contendo peptídios de baixo peso molecular, de preferência di- e tripeptídios (MEREDITH; DITESHEIM; ZALOGA, 1990; FROKJAER, 1994; SCHMIDL; TAYLOR; NORDLEE, 1994; CLEMENTE, 2000).

Uma diferença importante entre as proteínas refere-se à estrutura primária ou sequência de aminoácidos. Nas proteínas de soro, aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos estão distribuídos aleatoriamente ao longo da cadeia peptídica, enquanto que as caseínas apresentam domínios distintos, hidrofóbicos e hidrofílicos (SWAISGOOD, 1982).

A hidrólise de proteínas com diferentes distribuições de cargas e predominância de grupos hidrofóbicos resulta em peptídios que diferem na distribuição de grupos laterais hidrofílicos/hidrofóbicos. Em um estudo com hidrolisados de β -lactoglobulina e caseína, verificou-se que todos os peptídios

obtidos da hidrólise da β -lactoglobulina apresentavam distribuição similar de cargas e grupos hidrofóbicos. Ao contrário, os peptídios obtidos a partir da hidrólise da caseína apresentavam diferenças na distribuição de cargas e aminoácidos hidrofóbicos ao longo do peptídio (CAESSENS et al., 1999).

Peptídios com diferentes bioatividades foram isolados e caracterizados a partir de proteínas do leite bovino dentre os quais: opióides, antihipertensivos, antitrombóticos, imunomoduladores (KORHONEN et al., 1998; XU, 1998; CLARE; SWAISGOOD, 2000; PIHLANTO-LEPPALA, 2001; OTANI; MONAI, 1993; OTANI; HATA, 1995; OTANI; ODASHIMA, 1997; WONG et al., 1997). A β -caseína e a κ -caseína, em particular e o componente glicomacropeptídio da κ -caseína, exercem uma variedade de efeitos estimulatórios e supressores nas funções das células mononucleares (OTANI; HORIMOTO; MONAI, 1996).

Vários trabalhos afirmam que as propriedades das proteínas do soro de leite, benéficas à saúde, estão na dependência de algumas de suas proteínas promoverem um estímulo a síntese intracelular de glutathione, o que ocorre em todos os tecidos principalmente no fígado, envolvendo duas enzimas (glutamil cisteinil sintetase), tendo como substrato ácido glutâmico e cisteína. Nesta reação a cisteína é o substrato limitante. A segunda parte da síntese envolve a enzima glutathione sintetase, que catalisa a adição do aminoácido glicina ao dipeptídio glutamil-cisteína, formando o tripeptídio glutathione – GSH (glutamil-cisteinil-glicina).

Há evidências de que o balanço de aminoácidos da dieta exerce um efeito importante no valor nutritivo da proteína e, portanto, na homeostase da glutathione celular (LYONS et al., 2000). Em particular, o provimento adequado de aminoácidos sulfurados bem como de glutamato (glutamina ou aminoácidos de cadeias ramificadas) e glicina (ou serina) constitui fator crítico para a maximização da síntese celular de glutathione.

A glutathione desempenha papel vital no metabolismo celular através das seguintes funções (WU et al., 2004): 1) como neutralizadora de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (radicais hidroxil, peroxil, peroxinitrito e H_2O_2) diretamente e indiretamente através de reações enzimáticas; 2) reage com várias

substâncias eletrofílicas e metabólitos fisiológicos (estrógenos, melaninas, prostaglandinas e leucotrienos) e xenobióticos (bromobenzeno e acetaminofen) formando mercapturatos, reações iniciadas pela glutathione-S-transferase (família de enzimas desintoxicantes que atuam na Fase II da carcinogênese; 3) a GSH pode conjugar-se com NO para formar aducto S-nitroso-glutathione, que é posteriormente clivado pelo sistema tioredoxina liberando GSH e NO; tanto GSH como NO são substâncias necessárias para a função hepática de ativação de agentes sensibilizadores da insulina; 4) a GSH serve de substrato para a enzima formaldeído desidrogenase, convertendo formaldeído e GSH em S-formil-GSH. A remoção de formaldeído (agente carcinógeno) é de importância fisiológica, por ser formado a partir do metabolismo da metionina, colina, metanol, sarcosina e xenobióticos, via citocromo P450; 5) a GSH é necessária para a conversão de prostaglandina H₂ (metabólito do ácido araquidônico) em prostaglandina D₂ e E₂ (anti-inflamatórias), pela endoperoxídeo isomerase; 6) glutathionilação de proteínas (tioredoxina), enzima de conjugação de ubiquitina e oxidase de citocromo C, reações importantes na fisiologia celular.

Concentrações adequadas de GSH são necessárias para a proliferação de células, incluindo linfócitos e células do epitélio intestinal. A GSH desempenha papel importante na espermatogênese e na maturação do espermatozóide. Além disso, é essencial para ativação de linfócitos T e leucócitos polimorfonucleares, bem como, na produção de citocinas. Portanto, a glutathione é essencial para o sucesso da reposta imune, quando o hospedeiro é desafiado imunologicamente.

Neste capítulo procurou-se estudar, comparativamente, aspectos nutricionais entre a caseína e seus hidrolisados e o impacto dessas fontes protéicas na síntese hepática de glutathione, comparativamente a um concentrado de proteínas de soro de leite, não desnaturado (CSD). Estudou-se ainda o efeito da hidrólise enzimática da caseína sobre seu valor nutritivo.

3.2 Objetivos

- Avaliar o efeito de proteínas da dieta e de seus hidrolisados no crescimento de ratos da linhagem Wistar.
- Avaliar os efeitos de proteínas da dieta em diversos índices de qualidade protéica.
- Verificar o efeito de proteínas da dieta, íntegras ou hidrolisadas, nos níveis de proteínas séricas.
- Determinar os efeitos das dietas contendo as proteínas íntegras ou hidrolisadas nas concentrações de glutatona hepática.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Obtenção das matérias-prima

O concentrado protéico de soro doce foi produzido em planta piloto do TecnoLat, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP, conforme metodologia apresentada no capítulo 2 (BORGS et al., 2001). A caseína comercial foi obtida da MCassab, São Paulo, SP. Foram utilizados dois hidrolisados de caseína, um deles (Hyprol 8052), 20% GH, obtido da Kerry Bio-Science (Netherlands) e o outro, 30% GH, foi produzido no laboratório de Bioquímica do Centro de Química do ITAL, Campinas.

3.3.2 Hidrólise enzimática e determinação do grau de hidrólise (GH%)

Para efetuar a hidrólise enzimática da caseína comercial, utilizou-se a enzima Flavourzyme (Novo Nordisk), que é uma preparação composta de várias endoproteases e exopeptidases (amino e carboxi terminal), que hidrolisa proteínas

extensivamente, em condições de pH de aproximadamente 7,0 a 40°C. O pH foi monitorado durante toda a hidrólise e quando necessário, era adicionada soda (solução de hidróxido de sódio) para que o pH se mantivesse próximo de 7,0. Em cada hidrólise partiu-se de 7g de proteína dissolvidas em 200mL de água destilada, onde foram adicionados 2mL de enzima nas condições já descritas acima, permanecendo sob agitação constante por aproximadamente 60 a 70 minutos para obtenção de grau de hidrólise em torno de 30%, verificado pela reação do TNBS (ADLER-NISSEN, 1979). Esse método consiste na medida espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação entre o ácido trinitro-benzenosulfônico (TNBS) e aminas primárias sob condições alcalinas. Após 1 hora de incubação a reação foi interrompida por abaixamento do pH. A amostra foi dispersa em dodecil sulfato de sódio (SDS) e a reação ocorreu em presença de tampão fosfato 0,2125M e pH $8,2 \pm 0,02$. Como padrão utilizou-se L-leucina. A leitura foi efetuada a 340nm.

3.3.3 Caracterização dos hidrolisados

♦ Composição centesimal

- **Nitrogênio Total:** determinado pelo método microKjeldahl, segundo método descrito na AOAC (1990).
- **Umidade e sólidos totais:** foram determinados de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990). Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento até peso constante e pesagem do resíduo sólido.
- **Resíduo mineral (cinza):** determinado de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990). Baseia-se na determinação do resíduo inorgânico resultante da calcinação de toda matéria orgânica da amostra.

- **Lipídios Totais:** determinados pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959), levando-se em conta as proporções recomendadas entre os solventes clorofórmio, metanol e água destilada, 1:2:0,8 para a primeira diluição e 2:2:1,8 para a segunda diluição. Após a eliminação do solvente os lipídios extraídos foram determinados gravimetricamente.

- **Lactose:** a determinação de lactose foi feita de acordo com metodologia de Acton (1977).

♦ **Determinação de aminoácidos**

A composição em aminoácidos, com exceção do triptofano, foi determinada por hidrólise ácida, seguindo o método de Spackman, Stein e Moore (1958), com algumas modificações. Pesou-se uma alíquota de 25mg de proteína da amostra e hidrolisou-se com 10mL de HCl 6N em tubos de hidrólise, selado sob vácuo, e mantido à temperatura de 110°C por 22 horas. Após incubação, o ácido clorídrico foi evaporado e a amostra foi recuperada em tampão citrato de sódio pH 2,2 (Diluyente marca Pickering, USA). Uma alíquota de 25µL foi injetada em analisador Dionex DX-300 para separação de aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina (marca Pickering), usando-se como referência, para identificação e cálculo, uma solução padrão de aminoácidos (marca Pierce, USA). O triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado após hidrólise enzimática com pronase (100mg/10mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5) a 40°C por 24 horas, seguido de reação colorimétrica com solução de 4-dimetilamino benzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,2N e leitura de absorbância a 590nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão (SPIES, 1967).

3.3.4 Ensaio biológico com ratos

Efetuada para verificar a influência da composição de aminoácidos e estrutura da proteína íntegra ou hidrolisada no valor nutritivo e no estímulo à síntese de glutatona hepática e proteínas séricas. O protocolo experimental está descrito na figura 1.

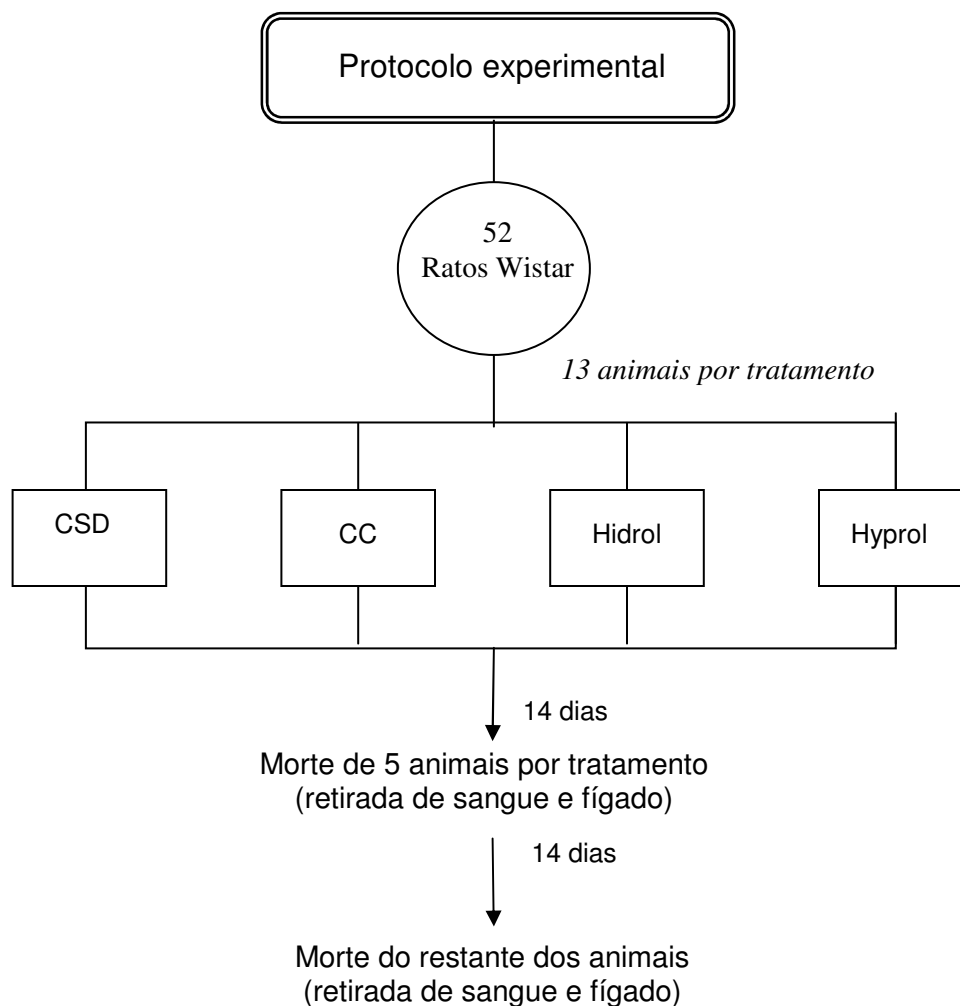


Figura 1 - Protocolo experimental do ensaio biológico efetuado com ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados durante 28 dias com dietas contendo 12% de proteínas, a saber: CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH) e Hyprol (caseína hidrolisada comercial com 20% GH).

- Animais

Utilizaram-se 52 ratos Wistar machos recém-desmamados, obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas - CEMIB, Unicamp. Após três dias em adaptação recebendo ração comercial, os ratos foram distribuídos em quatro grupos experimentais, de maneira que não houvesse grandes diferenças nas médias de peso entre os grupos, sendo aleatoriamente designados aos tratamentos. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, ficando nas dietas experimentais durante 28 dias. Dietas e água foram fornecidas “ad libitum”.

Após 14 dias em dieta, foram mortos cinco animais de cada tratamento, dos quais foram coletados o sangue e o fígado para análises. A ingestão de dieta e o ganho de peso foram avaliados. Os animais foram pesados semanalmente e as dietas três vezes por semana. Ao final do experimento o restante dos animais foram mortos. Os materiais coletados (sangue e fígados) nos dois tempos (14 e 28 dias) foram utilizados para dosagem de glutathiona hepática e proteínas séricas (total, albumina, globulina). Também foi efetuada a avaliação nutricional das dietas por meio do cálculo do quociente de eficiência protéica (PER), que avalia o ganho de peso em gramas por unidade de proteína ingerida também em gramas, de um grupo de animais submetidos à dieta contendo a proteína em estudo (SGARBIERI, 1996).

- ♦ Composição das dietas experimentais

As dietas foram formuladas de acordo com a AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993) modificada, contendo 12% de proteínas, alterando-se a quantidade, o tipo e formas de proteína da dieta (íntegra ou hidrolisada), sendo isoprotéicas e isocalóricas. Foram utilizadas quatro dietas experimentais, correspondendo aos seguintes tratamentos: CSD - concentrado protéico de soro doce de leite bovino; CC – caseína comercial; Hidrol – caseína hidrolisada em laboratório (30% GH) e Hyprol – caseína hidrolisada comercial (20% GH).

- **Dosagem de glutathiona hepática** – utilizou-se o método colorimétrico (SAVILLE, 1958) modificado, para quantificar a GSH livre presente nos fígados dos ratos. Os órgãos foram coletados imediatamente após a morte dos animais, sendo congelados e homogeneizado em nitrogênio líquido, ficando armazenados em nitrogênio até o momento da análise. Para a análise tomaram-se alíquotas de amostra de 0,1 a 0,2g. Adicionaram-se 5mL de ASS (ácido sulfosalicílico) precipitando assim as proteínas, e imediatamente a amostra foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos. Utilizaram-se 200µL do sobrenadante, e para a reação colorimétrica foram utilizados vários reagentes (A, B, C, D) que transformam os grupos sulfidrilos (SH) em ácido nitroso, catalisado por Hg^{2+} em quantidade equimolar. Finalmente, o ácido nitroso reage com um reagente contendo sulfonilamida e outro contendo N-1-naftiletilenodiamina para formar o azo-cromóforo brilhante que é lido a 540nm, e quantificado com auxílio de uma curva-padrão de GSH.

3.3.5 Análises estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa “Statistic: Basic Statistics and Tables”. Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (GOMES, 1982).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Composição centesimal dos materiais protéicos

A composição dos materiais utilizados como fonte de proteínas nas dietas e sua composição em aminoácidos encontram-se nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Composição centesimal aproximada (média \pm desvio padrão) de concentrados e hidrolisados protéicos.

Componente (base seca)	Fontes protéicas			
	CC	CSD	Hidrol	Hyprol
Proteínas*	82,8 \pm 2,70 ^b	85,60 \pm 4,55 ^{ab}	78,53 \pm 0,55 ^c	88,61 \pm 0,56 ^a
Lipídios totais	1,9 \pm 0,25 ^b	6,15 \pm 0,17 ^a	1,20 \pm 0,05 ^c	0,8 \pm 0,04 ^d
Cinza	3,5 \pm 0,75 ^b	2,25 \pm 0,50 ^c	4,54 \pm 1,25 ^{ab}	5,72 \pm 1,35 ^a
Carboidratos**	11,7 \pm 1,96 ^a	5,01 \pm 0,85 ^c	8,26 \pm 1,24 ^b	1,75 \pm 0,26 ^d

*N x fator de conversão 6,38. Determinações feitas em triplicata. CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH); e Hyprol (caseína hidrolisada comercial 20% GH).

**Determinado como lactose. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O CSD e o Hyprol apresentaram o mais alto teor de proteína, o Hidrol o mais baixo e a CC um valor intermediário. O teor mais elevado de lipídios totais foi o do CSD e o mais baixo do Hyprol.

Os teores de cinza foram mais elevados nos dois hidrolisados em virtude da necessidade da adição de álcali durante a hidrólise para o controle do pH (pH \sim 7,0). Carboidratos apresentaram-se mais elevados na CC e mais reduzidos no hidrolisado Hyprol.

As tabelas 2 e 3 referem-se à composição de aminoácidos (gAA/100g proteína) para a caseína comercial (CC), para um hidrolisado comercial de caseína com 20% GH (Hyprol), um hidrolisado de caseína produzida em laboratório, com 30% GH pela enzima Flavourzyme (Hidrol) e do concentrado de soro doce de leite bovino (CSD).

Comparando o perfil aminoacídico da CC e do CSD (Tabela 2), torna-se aparente as seguintes diferenças: a cisteína apresentou-se elevada no CSD (2,3g/100g p) versus (0,2g/100g p) para a caseína, a somatória Cys + met atinge

4,6 para o CSD contra 3,3 para a caseína; os aminoácidos de cadeias aromáticas (Phe, Tyr), mostraram concentrações mais elevadas na CC que no CSD, respectivamente 5,3 e 5,7 na CC versus 3,2 e 2,9 no CSD, a somatória (Phe, Tyr) é de 11,1g/100g para CC contra 6,1g no CSD; a histidina apresentou-se mais elevada no CSD (5,1g/100g) versus 2,9g na CC, a somatória (Glu + Gln), expressa como ácido glutâmico na análise, mostrou-se mais elevada (23,3g/100g) na CC contra (16,6g/100g) no CSD.

Comparando a CC (íntegra) com os seus hidrolisados enzimáticos nota-se uma pequena perda na maioria dos aminoácidos, perda que foi maior no Hidrol comparado com o Hyprol.

A perda relativa dos aminoácidos entre a CC e seus hidrolisados pode ser notada pela somatória de todos os aminoácidos (120,3g) para a CC versus (109,3 e 95,4g) respectivamente para o Hyprol e Hidrol.

O escore ideal de aminoácidos essenciais (EAE), igual ou superior a 1,0 foi atingido em todos os concentrados estudados.

Avanços recentes nas pesquisas biomédicas têm revelado interrelações complexas entre nutrição e doença. Essas pesquisas têm sugerido que proteínas alimentícias, peptídios de origem alimentar e aminoácidos, poderão ser importantes no tratamento de um certo número de condições e/ou estados patológicos resultantes de doenças ou traumas.

Pesquisas realizadas por Brennan e colaboradores (1986) determinaram que níveis elevados dos aminoácidos de cadeias ramificadas (ACR) como leucina, isoleucina e valina podem ajudar na cicatrização de traumas múltiplos e em pacientes com queimaduras (ALEXANDER; GOTTSCHLISH, 1990). Os mecanismos fisiológicos desses efeitos benéficos não foram totalmente explicados. Durante o estado metabólico anormal, imposto por situações de estresse ou trauma, as vias normais de utilização de ácidos graxos e glicose ficaram prejudicadas. Sob essas condições o catabolismo dos ACR é aumentado para compensar as necessidades de ácidos graxos e glicose, particularmente no tecido muscular, ajudando a conservar os processos metabólicos normais.

Tabela 2 - Perfil de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) em base seca, e escore de aminoácidos essenciais (EAE) de concentrado protéico de soro de leite bovino, caseína comercial e hidrolisados, comparados com a referência da FAO/WHO*.

Aminoácidos (g/100g prot)	CC	Hyprol	Hidrol	CSD
Thr	4,3	3,8	3,5	6,4
Met	3,1	2,6	1,1	2,3
Cys	0,2	0,2	1,5	2,3
Met+Cys	3,3	2,8	2,6	4,6
Val	6,2	6,0	4,8	5,0
Leu	9,8	8,7	7,5	9,8
Ile	4,6	4,6	3,9	5,3
Phe	5,3	4,7	4,1	3,2
Tyr	5,7	5,0	4,4	2,9
Phe+ Tyr	11,1	9,7	8,5	6,1**
Lys	7,4	7,3	6,2	9,3
His	2,9	2,5	1,9	5,1
Trp	1,2	1,1	1,0**	1,1
Asp + Asn	7,8	6,2	6,1	9,6
Ser	6,5	5,3	4,8	5,1
Glu + Gln	23,3	20,7	19,1	16,6
Pro	8,9	10,2	8,6	5,5
Gly	1,9	1,6	1,5	1,7
Ala	3,1	2,8	2,4	4,4
Arg	3,7	3,5	2,9	1,5
EAE ***	1,0	1,0	1,0	1,0
Σ AA ****	120,3	109,3	96,4	107,8

*FAO/WHO (1990): Thr = 3,4; Met + Cys = 2,5; Val = 3,5; Leu = 6,6; Ile = 2,8; Phe + Tyr = 6,3; Lys = 5,8; His = 1,9; Trp = 1,1. Resultados médios de determinações feitas em duplicata. **Aminoácido mais limitante em relação ao padrão FAO/WHO (1990). CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hyprol (caseína hidrolisada comercial 20% GH) e Hidrol (caseína hidrolisada no laboratório, ITAL, 30% GH). ***EAE (escore de aminoácidos essenciais); ****Σ AA (somatória dos aminoácidos).

A glutamina tem importância na manutenção da integridade dos tecidos gastrointestinais, tanto na saúde como na doença. Ela é o principal combustível dos enterócitos, macrófagos e linfócitos e dos fibroblastos e é considerado um aminoácido essencial em algumas condições inflamatórias e ferimentos (SOLTAN, 2009). Estudos em animais (ROMBEAU, 1990) demonstraram que a suplementação da dieta com glutamina promove efeito trófico no trato gastrointestinal (TGI) garantindo sua integridade. Dietas com baixo teor de glutamina podem causar alterações degenerativas na mucosa intestinal e consequentemente prejuízo para a absorção de nutrientes. A glutamina tem demonstrado prevenir a hiperpermeabilidade intestinal e a translocação bacteriana em camundongos (SOLTAN, 2009).

A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma, na forma livre, participa de uma variedade de reações metabólicas entre elas a de servir de combustível para linfócitos e outras células de multiplicação rápida, como as da mucosa gastrointestinal. Da mesma forma que a arginina, a glutamina é classificada como aminoácido não essencial, mas, evidências experimentais mostraram que esses aminoácidos podem ser considerados condicionalmente essenciais, ou seja, sua síntese endógena torna-se quantitativamente inadequada para suprir as necessidades do organismo, submetido à certas condições clínicas (LACEY; WILMORE, 1990). Estudos de Newsholme e Parry Billings (1990) sugeriram que a velocidade de utilização de glutamina por macrófagos e linfócitos e, possivelmente por todas as células do sistema imune seja similar ou superior que à da glicose, mesmo em células em repouso (quiescentes).

O elevado consumo de glutamina pode prover condições ótimas para a regulação do uso dos intermediários da síntese de nucleotídeos da purina e da pirimidina, durante o ciclo celular. Um decréscimo significativo na disponibilidade de glutamina pode resultar em redução na proliferação de linfócitos ou em sua habilidade de responder prontamente aos desafios imunológicos.

A glutamina tem sido identificada como um nutriente crítico para a manutenção do sistema imune intestinal (tecido linfático associado ao intestino) e na síntese da imunoglobulina A secretória (IgAs), bem como na prevenção da

translocação de bactérias do intestino para a circulação, nos estresses de queimaduras, cirurgias e outros traumas (ALVERDY, 1990; SOLTAN, 2009).

Alguns aminoácidos como aspártico, glutâmico, fenilalanina, tirosina e triptofano influenciam, direta ou indiretamente, o funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Fenilalanina, tirosina e triptofano são transportados do sangue para o cérebro, onde são convertidos pelo tecido neural, nos neurotransmissores 5-hidroxitriptamina e serotonina (derivadas do triptofano), dopamina, norepinefrina e epinefrina (derivadas da fenilalanina e tirosina). Esses neurotransmissores modulam diversos processos fisiológicos e psicológicos, incluindo o estado mental e o humor. Embora a dieta efetivamente altere as concentrações de triptofano, fenilalanina e tirosina no cérebro, nenhum estudo científico, cuidadosamente controlado, foi encontrado que demonstre a influência da dieta nos níveis e funções dos neurotransmissores no cérebro de indivíduos saudáveis (FERNSTROM, 1991). Para produzir um efeito terapêutico esses aminoácidos deverão ser ingeridos em doses bem superiores às recomendações dietéticas e, normalmente contidas em dietas nutricionalmente balanceadas, do ponto de vista protéico.

Os ácidos aspártico e glutâmico estão normalmente presentes em elevadas concentrações no SNC onde atuam como neurotransmissores excitatórios, promovendo a despolarização das membranas neurais. Uma dieta balanceada mantém níveis adequados desses neurotransmissores pelo fato da maioria das proteínas alimentícias apresentarem níveis elevados desses aminoácidos (LIMA, 2007).

Existe a preocupação quanto à ingestão de quantidades elevadas de alimentos processados contendo excesso de glutamato monossódico como flavorizante.

Infelizmente, na grande maioria das análises de aminoácidos, não se distinguem o aspartato da asparagina e o glutamato da glutamina, uma vez que a hidrólise ácida empregada na análise promove a desaminação das amidas glutamina e asparagina, portanto, torna-se impossível saber os teores dessas amidas, originalmente presentes nas amostras.

A observação da Tabela 3 mostra teores mais elevados dos aminoácidos de cadeias ramificadas (ACR) para a CC e para o CSD, sugerindo que os processos de hidrólise enzimática e/ou análise dos aminoácidos provocaram perdas desses aminoácidos. Por outro lado, as somas dos aminoácidos de cadeias aromáticas (AAr) se apresentaram mais elevadas na caseína e seus hidrolisados do que no CSD. Essa característica tem sido interpretada pelos pesquisadores como uma vantagem das proteínas do soro de leite na formulação de dieta para fenilcetonúricos, já que esses indivíduos não metabolizam a fenilalanina e seu acúmulo poderá causar distúrbios ao SNC. Bounous e col. (1983) verificaram que a adição de Phe em uma dieta de proteínas de soro de leite bovino (20g p/100g dieta) para atingir o nível de Phe da caseína, diminuiu o poder imunoestimulatório (CFP) no baço em 30%. Portanto, o baixo nível de AAr, inclusive de Phe, poderá ser mais um fator de diferenciação do poder imunoestimulante do CSD em relação à caseína.

As somas do glutamato mais glutamina (expresso na análise como ácido glutâmico) mostraram-se mais elevadas para a CC e seus hidrolisados comparadas com o CSD, sem a possibilidade de distinção entre os teores de ácido glutâmico e de glutamina.

A Tabela 3 mostra também as diferenças entre as somas dos aminoácidos de cadeias sulfuradas (Cys + Met) para a CC e seus hidrolisados, comparadas com a do CSD, bem mais elevada para o concentrado de soro doce.

Se comparados os dados da Tabela 2, pode-se verificar que a diferença entre a soma dos sulfurados pode ser atribuída particularmente à cisteína (Cys), bem mais elevada no CSD.

O teor de 1,5g Cys/100g proteína no Hidrol, não está coerente com 0,2g/100g proteína determinada na caseína comercial (CC) e no hidrolisado comercial da caseína Hyprol.

Tabela 3 – Aminoácidos essenciais e condicionalmente essenciais com propriedades funcionais fisiológicas.

Aminoácidos (g/100g proteína)	CC	Hyprol	Hidrol	CSD
Cys + Met	3,3	2,8	2,6	4,6
ACR (Leu, Ile, Val)	20,6	15,3	16,2	20,1
AAr (Phe, Tyr, Trp)	12,2	10,8	9,5	7,2
Asp + Asn	7,8	6,2	6,1	9,6
Glu + Gln	23,3	20,7	19,1	16,6
Gly	1,9	1,6	1,5	1,7
Σ (Somatória)	69,1	57,4	55,0	59,8

CC = caseína comercial; Hyprol = caseína hidrolisada comercial (GH 20%); Hidrol = caseína hidrolisada em laboratório ITAL (GH 30%); CSD = concentrado de soro doce.

A importância da elevada concentração de aminoácidos de cadeias sulfuradas particularmente a cisteína/cistina será discutida mais adiante neste capítulo.

3.4.2 Ganho de peso

O aspecto saudável dos animais mostrou que tanto o estado sanitário como o manejo dos animais foram adequados e que a natureza das proteínas na dieta, não modificou aparentemente a saúde dos mesmos. A evolução de peso verificada com os animais encontra-se na figura 2. Os valores obtidos de ganho de peso, consumo de dietas e PER encontram-se na tabela 4.

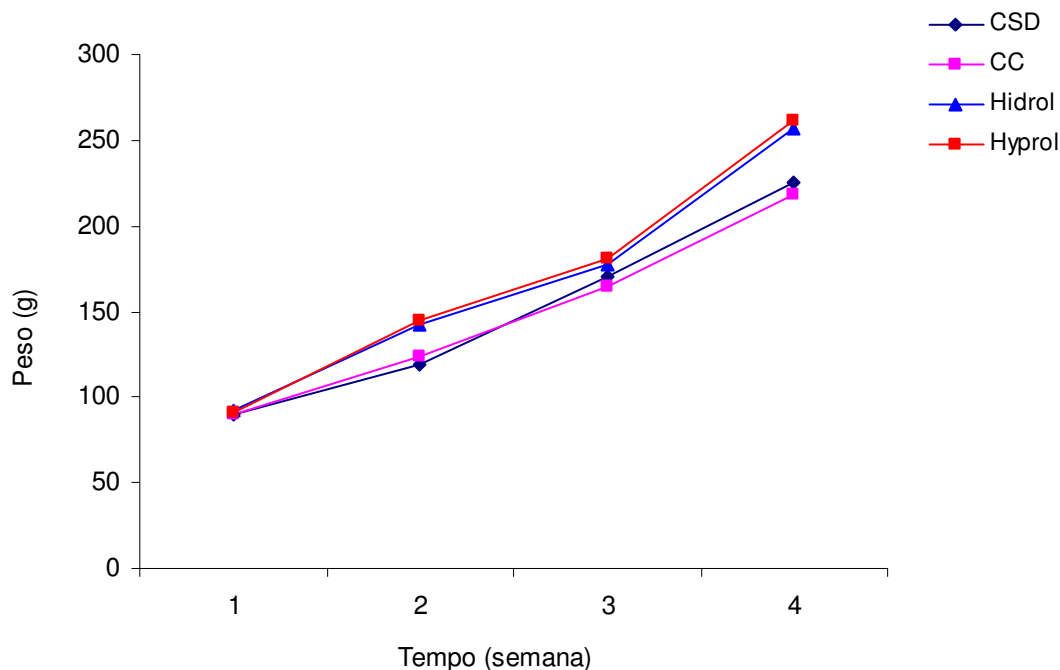


Figura 2 - Evolução de peso (g) verificada com ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas com 12% de proteína, correspondendo aos tratamentos: CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH); Hyprol (caseína hidrolisada comercial - 20% GH). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Conforme apresentado na tabela 4, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para o ganho de peso, consumo de dieta e PER, o que indicou, nesta pesquisa, que o processo de hidrólise não favoreceu a melhor utilização da proteína da dieta. Friedman (1996) considera um valor nutritivo adequado para proteínas com valor de PER acima de 2,0.

Tabela 4 - Ganho de peso e consumo de dieta (média \pm desvio padrão), obtidos com ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas contendo 12% de proteína, por 4 semanas.

Tratamentos	Ganho de peso (g)	Consumo de dietas (g)	PER
CSD	141,98 \pm 14,51 ^a	348,00 \pm 50,64 ^a	3,40 \pm 0,65 ^a
CC	151,13 \pm 14,79 ^a	354,77 \pm 69,54 ^a	3,55 \pm 0,66 ^a
Hidrol	144,99 \pm 15,85 ^a	324,80 \pm 41,51 ^a	3,72 \pm 0,21 ^a
Hyprol	153,99 \pm 9,06 ^a	332,45 \pm 52,07 ^a	3,86 \pm 0,79 ^a

CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH); e Hyprol (caseína hidrolisada comercial 20% GH). Valores com letras iguais (colunas) não apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Boza e colaboradores (1995) compararam a eficiência do soro de leite e caseína como proteínas íntegras e de seus hidrolisados enzimáticos na recuperação de ratos desmamados parcialmente desnutridos. Não foram encontradas diferenças entre proteínas íntegras e hidrolisados que foram utilizados nas dietas. Por outro lado, a comparação da eficiência de recuperação de ratos desnutridos alimentados com hidrolisado de proteína de leite foi superior a uma mistura de aminoácidos de composição similar (BOZA et al., 2000). A literatura disponível sobre propriedades funcionais fisiológicas tem dado pouca atenção à forma físico-química na qual o hidrolisado chega ao organismo ou à influência do grau de hidrólise (PIMENTA et al., 2006).

Tassi, Amaya-Farfan e Azevedo (1998) investigaram os efeitos de dietas contendo α -lactalbumina bovina intacta ou hidrolisada (15% de grau de hidrólise) utilizada como única fonte protéica em ratos submetidos ao exercício e concluíram que a forma hidrolisada apresentou-se mais vantajosa do que a proteína intacta.

As tabelas 5 e 6 apresentam os valores encontrados para proteína total, albumina e relação albumina/globulina, séricas.

Tabela 5 - Proteína total (g/dL), albumina (g/dL) e relação albumina/globulina, (média \pm desvio padrão), determinados no soro sangüíneo de ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas contendo 12% de proteína após 14 dias de ensaio.

Tratamentos	Proteína total (g/dL)	Albumina (g/dL)	Relação A/G
CSD	5,37 \pm 0,39 ^a	3,72 \pm 0,40 ^a	2,23 \pm 0,43 ^a
CC	6,84 \pm 1,93 ^a	4,07 \pm 0,56 ^a	1,47 \pm 0,35 ^b
Hidrol	6,15 \pm 0,65 ^a	4,18 \pm 0,46 ^a	2,12 \pm 0,37 ^a
Hyprol	6,18 \pm 0,62 ^a	4,20 \pm 0,39 ^a	2,13 \pm 0,19 ^a

CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH); Hyprol (caseína hidrolisada comercial 20% GH). A/G = relação albumina/globulina. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para a relação A/G.

Conforme apresentado na Tabela 5, apenas a relação albumina/globulina apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para os parâmetros séricos analisados, sendo que para a CC a relação (A/G) foi estatisticamente inferior que para os demais tratamentos (aos 14 dias de experimento).

Os mesmos parâmetros sangüíneos da Tabela 5, quando analisados aos 28 dias (Tabela 6) apresentaram maior variação estatística. Para proteína total não houve diferença estatística entre os tratamentos CSD e CC ($p > 0,05$). Proteína total foi estatisticamente inferior para o hidrolisado (Hidrol), sendo que o Hyprol se igualou, estatisticamente à CC, porém, inferior ao CSD. Quanto à albumina o CSD apresentou concentração estatisticamente superior ($p < 0,05$),

aos demais tratamentos. A relação A/G foi estatisticamente inferior para o Hidrol, em relação ao CSD. Os concentrados CSD, CC e Hyprol, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) quanto à relação A/G.

Tabela 6 - Proteína total (g/dL), albumina (g/dL) e relação albumina/globulina, (média \pm desvio padrão), feitas no soro sangüíneo de ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar, alimentados com dietas contendo 12% de proteína, após 28 dias de ensaio.

Tratamentos	Proteína total (g/dL)	Albumina (g/dL)	Relação A/G
CSD	4,98 \pm 0,41 ^a	3,73 \pm 0,17 ^a	3,03 \pm 0,37 ^a
CC	3,89 \pm 0,82 ^{ab}	2,83 \pm 0,29 ^b	2,68 \pm 0,23 ^{ab}
Hidrol	3,20 \pm 0,15 ^c	2,25 \pm 0,57 ^b	2,37 \pm 0,39 ^b
Hyprol	3,58 \pm 0,23 ^b	2,60 \pm 0,59 ^b	2,66 \pm 0,32 ^{ab}

CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada - 30% GH); Hyprol (caseína hidrolisada comercial 20% GH). A/G = albumina/globulina. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tassi (1996) verificou em ensaio com animais de laboratório que o consumo de dieta com proteína de soro parcialmente hidrolisada (grau de hidrólise de 15%) foi capaz de preservar os teores séricos de glicose, albumina e glicogênio muscular após exercício exaustivo. Já Ramos (2001) trabalhando com um hidrolisado protéico de soro lácteo com grau de hidrólise alto (30%) não observou o mesmo efeito, conforme esperado para proteínas de mais rápida absorção, devido à alta concentração de aminoácidos livres.

Anderson e colaboradores (2008) verificaram que um preparado enzimático Aminogen®, uma mistura patenteada de proteases dos *Aspergillus niger* e *oryzae*, aumentou o metabolismo de um concentrado comercial de proteínas do soro de

leite bovino (WPC). Dois grupos controles de indivíduos de sexo masculino receberam 50g de WPC diários. Nove dias após início do experimento, o grupo experimental passou a receber 50g WPC contendo 2,5g ou 5g do Aminogen®. Os resultados indicaram que os aminoácidos séricos totais dos sujeitos aumentaram em 56% e 186%, em relação ao controle com 2,5 e 5g de Aminogen®, respectivamente. A suplementação com o preparado enzimático também elevou significativamente o balanço de N₂, baixou os níveis de proteína C reativa (PCR) e sugeriu uma tendência de abaixamento da pressão sangüínea diastólica (PSD). Os autores concluíram que o Aminogen® elevou o metabolismo do WPC processado comercialmente aumentando os níveis de aminoácidos séricos totais e o balanço de N₂.

No presente estudo a hidrólise da caseína (CC) com 20 e 30% de grau de hidrólise, não afetou o desenvolvimento corporal e o PER da caseína que também não diferiu do concentrado protéico de soro (CSD). Há, contudo, uma necessidade de se estudar com maior profundidade as influências do processamento na qualidade nutricional e funcional das proteínas, particularmente as que receberam alegações de propriedades funcionais fisiológicas.

Os processamentos térmico e mecânico tendem a desnaturar as proteínas e, com a desnaturação poderá haver modificações, não somente no grau de digestibilidade, mas também na biodisponibilidade de aminoácidos para o metabolismo. Poderá haver também influência na especificidade de hidrólise das proteases e, conseqüentemente, nos produtos da hidrólise enzimática, alterando a velocidade e os mecanismos de absorção dos peptídios, bem como sua biodisponibilidade.

Já foi demonstrado (BOIRIE et al., 1997; BORÓ et al., 1995; FRÜHBECK, 1998; SGARBIERI et al., 2000) que a coagulação da caseína, nas condições ácidas do estômago e sua hidrólise parcial, pela pepsina, retarda a digestão e a velocidade de absorção dos aminoácidos e peptídios da caseína o que parece não ocorrer com as proteínas do soro do leite.

Pacheco e colaboradores (2005) estudaram a influência da hidrólise enzimática de um concentrado de soro de leite (CSD) produzido no ITAL, pelos

sistemas enzimáticos, pancreatina, protamex e alcalase, com mesmo grau de hidrólise (GH 20%). Observou-se que hidrolisado preparado pela ação da pancreatina continha uma porcentagem bem maior de aminoácidos livres (23%), o de protamex (2,2%) e o de alcalase (3,3%), comparado com o CSD (0,1%). O impacto da hidrólise nas propriedades funcionais, estímulo à síntese de IgM pela células de baço, e estímulo à síntese de glutathione (fígado), foram diferentes para os sistemas enzimáticos. O número de células formadoras de placa (baço) não diferiu estatisticamente entre o concentrado (não hidrolisado) e o hidrolisado de pancreatina ($p > 0,05$). A ordem crescente do estímulo à formação de placas (CFP) no baço pelos hidrolisados de CSD foi: pancreatina > protamex > alcalase > caseína comercial – CC (controle negativo). Resultados semelhantes foram observados para os teores de glutathione no fígado. Os resultados reportados por Pacheco e col. (2005) são interessante no sentido de mostrar que um material protéico hidrolisado ao mesmo grau de hidrólise, por sistemas enzimáticos diferentes pode apresentar propriedades funcionais fisiológicas diferentes.

Na fração conhecida como proteínas de soro de leite encontram-se albumina, lactoferrina e alfa-lactalbumina, as quais são ricas em resíduos de cistina. As estruturas primárias da albumina e da lactoferrina são ricas de sequência glutamylcistina, a qual é facilmente transportada para dentro das células tornando-a um substrato mais rapidamente disponível para a biossíntese da glutathione (BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989; BOUNOUS; GOLD, 1991). A Tabela 7 apresenta as concentrações de glutathione hepática encontradas para os diferentes tratamentos, estudados no presente trabalho.

Os resultados obtidos com as análises das concentrações de glutathione hepática neste estudo permitem inferir que o efeito melhorador da síntese de glutathione somente foi verificado com os animais que receberam dieta com proteínas de soro de leite. Verificou-se, ainda, um valor menor de glutathione nos animais que receberam o hidrolisado comercial (Hyprol) em T₂. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Pacheco e colaboradores (2005), também trabalhando com proteína íntegra e hidrolisados.

Tabela 7 - Concentrações de glutathiona (média \pm desvio padrão) medidas em fígados de ratos machos Wistar, alimentados durante 14 e 28 dias com dietas contendo 12% de diferentes proteínas.

Tratamentos	Glutathiona $\mu\text{mol/g}$ tecido (T1)	Glutathiona $\mu\text{mol/g}$ tecido (T2)
CSD	$8,56 \pm 0,66^a$	$8,79 \pm 0,17^a$
CC	$4,25 \pm 0,37^b$	$4,48 \pm 0,34^b$
Hidrol	$4,63 \pm 0,81^b$	$3,95 \pm 0,22^b$
Hyprol	$3,76 \pm 0,48^b$	$3,18 \pm 0,32^c$

CSD (concentrado protéico de soro doce); CC (caseína comercial); Hidrol (caseína hidrolisada em laboratório - 30% GH); e Hyprol (caseína hidrolisada comercial - 20% GH). T1= 14 dias T2= 28 dias Médias assinaladas pela mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

No presente trabalho a enzima usada na preparação do Hyprol (20% GH) não pode ser identificada. Para produção do Hidrol (30%GH) a enzima usada foi a flavourzyme (Novo Nordisk), por apresentar ampla faixa de tolerância ao pH e produzir pouco gosto amargo.

Vários pesquisadores consideram que o estímulo à síntese de glutathiona e o estímulo imunológico observado para o CSD dependem da liberação pelas proteínas de peptídeos contendo a sequência glutamilstistina nas sequências primárias das proteínas albumina sérica, β -lactoglobulina e imunoglobulina G (BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989; BOUNOUS; GOLD, 1991; BRINK, 1996).

Vários dados da literatura associam a composição do concentrado protéico de soro, especialmente com relação ao elevado teor de aminoácidos sulfurados como cisteína e metionina, ao aumento da síntese de glutathiona hepática, molécula que possui efeito desintoxicante, antioxidante e imunoestimulante, capaz de proteger o organismo de doenças como o câncer, imunossupressão e processos infecciosos (BOUNOUS; GOLD, 1991; PARODI, 1998; SGARBIERI, 1999; WALZEM, 1999). Embora se tenha demonstrado o poder do CSD estimular a síntese de GSH (fígado, baço), de estimular a produção de imunoglobulina M no

baço e a inter-relação entre esses dois fenômenos, os mecanismos de como essa interligação se processa ainda não foram explicados. Por outro lado, a importância do baixo teor de AAr, particularmente Phe, na modulação imunológica (BOUNOUS; LETORNEAU; KONGSHAVN, 1983) merece um estudo mais aprofundado, tanto com o CSD como com proteínas de soro isoladas e purificadas.

3.5 Conclusão

Concluiu-se que o soro de leite bovino (CSD) apresentou estímulo significativamente maior à síntese hepática de glutatona do que a caseína e seus dois hidrolisados enzimáticos ($p < 0,05$). A natureza da enzima e o processo de hidrólise podem ter sido responsáveis pelo menor valor de glutatona ($p < 0,05$) para o tratamento Hyprol (no 28º dia do experimento), em relação à caseína e o hidrolisado Hidrol. O perfil de proteínas séricas (proteína total, albumina e relação A/G) mostrou alterações quantitativas e qualitativas no 28º dia do experimento, sendo que o CSD foi o tratamento que manteve os níveis mais altos de proteína total e albumina séricas. Quanto aos parâmetros nutricionais, consumo de dieta, desenvolvimento corpóreo e quociente de eficiência protéica (PER), não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

3.6 REFERÊNCIAS

ACTON, G. H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 32, n. 3, p. 111-114, 1977.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.

ALEXANDER, J. M. GOTTSCHLISH, N. M. Nutritional immunomodulation in burn patients. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 18, p. S149-S153, 1990.

ALVERDY, J. C. Effects of glutamine supplemented diets on immunology of the gut. **JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thorofare, v. 14, p. S109-S113, 1990.

ANDERSON, M. L.; OBEN, J.; SHIL, C.; KOTHARI, M. S. An open label study to determine the effects of an oral proteolytic enzyme system on whey protein concentrate metabolism in healthy males. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, Larchmont, v. 5, n. 10, p. 1-10, 2008.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemistry**, 15th ed., Washington DC, 1990. 1141 p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M. P.; MAUBOIS, J. L.; BEAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate post-prandial protein secretion. **Proceedings of the National Academic of Science (USA)**, Washington, v. 94, n. 26, p. 14930-14935, 1997.

BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; PEREIRA DIAS, N. F. G.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

BORÓ, L.; GUADIX, E. M.; AUGUSTIN, O. M.; BOZA, J. J.; GIL, A. Serum amino acid concentrations in growing in rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate-based diets. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 68, n. 1, p. 55-61, 1995.

BOUNOUS, G. **The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate**. Scottsdale: Immunotec Research, 1997. 16 p.

BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, New York, v. 12, n. 3, p. 154-161, 1989.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P. A. L. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, n. 11, p. 1403-1408, 1985.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P. A. L.; GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. **Clinical and Investigative Medicine**, New York, v. 11, n. 4, p. 271-278, 1988.

BOUNOUS, G.; LETORNEAU, L.; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 113, n. 7, p. 1415-1421, 1983.

BOUNOUS; G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, New York, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

BOZA, J. J.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; BARO, L.; SUAREZ, M. D.; GIL, A. Protein vs protein hydrolyzates. Nitrogen utilization in starved rats. **British Journal of Nutrition**, London, v. 73, n. 1, p. 65-71, 1995.

BOZA, J. J.; MOENNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A. R.; GALDARD, W. Protein hydrolyzate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 39, n. 6, p. 237-243, 2000.

BRENNAM, M. F.; CERRA, F.; DALY, J. M.; FISCHER, J. E.; MULDAWER, L. L.; SMITH, R. J.; VINARS, E.; WANNEMACHER, R. YONG, V. R. Report of the Research Workshop: branched chain amino acids in stress and injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thorofare, v. 10, n. 5, p. 446-452, 1986.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**. Life Extension Foundation, Chicago, n. 1, p. 21-28, 1996.

CAESSENS, P. W. J. R.; DAAMEN, W. F.; GRUPPEN, H.; VISSER, S.; VORAGEN, A. G. J. β -Lactoglobulin hydrolysis. II. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v. 47, n. 8, p. 2980-2990, 1999.

CASTRO, G. A. Digestion and absorption. In: JOHNSON, L. R. (Ed.) **Gastrointestinal Physiology**, 4th ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. p. 108-130.

CASTRO, S.; PEYRONEL, D. V.; CANTERA, A. M. B. Proteolysis of whey proteins by the *Bacillus subtilis* enzyme preparation. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 285-294, 1996.

CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H. E. Bioactive milk peptides: a prospectus. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1187-1195, 2000.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, New York, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

DIAS, N. F. G. P.; SGARBIERI, V. C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in the mouse. **Le Lait**, Lyon, v. 86, n. 3, p. 213-226, 2006.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization on the United Nation/World Health Organization. **Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation**, Bethesda, Maryland, USA, 1990.

FERNSTROM, J. D. The influence of dietary proteins and amino acids on brain function. **Trends in Food Science and Technology**, New York, v. 2, n. 8, p. 201-204, 1991.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 1, p. 6-29, 1996.

FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 86-88, 1994.

FRÜHBECK, G. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, London, v. 391, p. 843-845, 1998.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 10. ed. São Paulo: Nobel, 1982. 430 p.

KORHONEN, H.; PILHANTO LEPPALA, A.; RANTAMAKI, P.; TUPASELA, T. The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. **Agricultural and Food Science**, Jokioinen, v. 7, n. 2, p. 283-296, 1998.

LACEY, J. M.; WILMORE, D. W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Reviews**, Washington, v. 48, n. 8, p. 297-309, 1990.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LIMA, D. D. **Papel neuroprotetor das vitaminas E e C sobre alterações bioquímicas e comportamentais em ratos submetidos ao modelo experimental de hiperprolinemia tipo 2**. Porto Alegre, RS: UFRS, 2007. 149p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

LYONS, J.; RAUH-PFEIFFER, A.; YU, Y. M.; LU, X. M.; ZURAKOWSKI, D.; TOMPKINS, R. G.; AJAMI, A. M.; YOUNG, V. R.; CASTILLO, L. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 97, n. 10, p. 5071-5076, 2000.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 89-95, 1994.

McINTOSH, G. H.; REGESTER, G. Q.; LE LEU, R. K.; ROYLE, P. J.; SMITHERS, G. W. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 4, p. 809-816, 1995.

MEISTER, A. The antioxidant effects of glutathione and ascorbic acid. In: PASQUIER, C. et al. (Eds.). **Oxidative stress. Cell activation and viral infection**. Basel: Birkhauser Verlag, 1994. p. 101-111.

MEREDITH, J. W.; DITESHEIM, J. A.; ZALOGA, G. Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than with intact protein diet. **Journal of Trauma**, Baltimore, v. 30, n. 7, p. 825–828, 1990.

MEZZAROBA, L. F. H.; CARVALHO, J. E.; PONEZI, A. N.; ANTONIO, M. A.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V. C. Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 9, p. 1005-1012, 2006.

MICKE, P.; BEEH, K. M.; BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 41, n. 1, p. 12-18, 2002.

MORENO, Y. F.; SGARBIERI, V. C.; SILVA, M. V.; TORO, A. A. D. C.; VILELA, M. M. S. Features of whey protein concentrate supplementation in children with rapidly progressive HIV infection. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 52, n. 1, p. 34-52, 2005.

NEWSHOLME, E. A.; PARRY-BILLINGS, M. Properties of glutamine release from the muscle and its importance for the immune system. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thorofare, v. 14 (suppl. 4), p. S63-S67, 1990.

OTANI, H.; HORIMOTO, Y.; MONNAI, M. Suppression of interleukin-2 receptor expression on mouse CD4⁺ T cells by bovine kappa-caseinoglycopeptide. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 6, p. 1017-1019, 1996.

OTANI, H.; MONNAI, M. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by bovine Milk kappa-casein digests. **Food and Agriculture Immunology**, Oxford, v. 5, p. 219-229, 1993.

OTANI, H.; HATA, I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 62, n. 2, p. 339-348, 1995.

OTANI, I.; ODASHIMA, M. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by lacto and ovotransferrins. **Food and Agriculture Immunology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 193-201, 1997.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PARODI, P. W. A role for milk protein in cancer prevention. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 53, n. 1, p. 37-47, 1998.

PIHLANTO–LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace–inhibitory peptides. **Trends in Food Science and Technology**, New York, v. 11, n. 9-10, p. 347–356, 2001.

PIMENTA, F. M. V.; ABECIA-SORIA, M. I.; AULER, F.; FARFAN, J. A. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, Washington DC, v. 16, n. 9, p. 984-991, 2006.

RAMOS, A. G. **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens**. Campinas, SP: Unicamp, 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2001.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROMBEAU, J. L. A review of the effects of glutamine-enriched diets on experimentally induced enterocolitis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thorofare, v. 14, (suppl. 4), p. S100-S105, 1990.

ROSANELI, C. F.; BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SGARBIERI, V. C. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 7, n. 3, p. 309-314, 2004.

ROSANELI, C. F.; BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SGARBIERI, V. C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 5, n. 4, p. 225-232, 2002.

SAVILLE, B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. **Analyst**, Cambridge, v. 83, n. 2, p. 670-672, 1958.

SCHLIMME, E.; MEISEL, H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. **Nahrung**, Berlin, v. 39, n. 1, p. 1-20, 1995.

SCHMIDL, M. K.; TAYLOR, S. L.; NORDLEE, J. A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 77-85, 1994.

SGARBIERI, V. C. **Food protein and peptides presenting specific protection to human health (a review)**. In: Food for health in the Pacific Rim, Food and nutrition Press, Inc., Trumbull, Conn, 1999. p. 335-352.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos** – Propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

SGARBIERI, V. C. RANGEL, H. A.; ZINSKY, P. F.; PACHECO, M. T. B.; PEREIRA DIAS, N. F. G. Novel Nutritional of milk Proteins. In: **Proceedings of the 4th International Conference of Food Science and Technology 2000**. Wuxi, China. Wuxi: University of Light Industry/National Association of Food, 2000. p. 196-209.

SIEMENSMA, A. D.; WEIJER, W. J.; BAK, H. J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. **Trends in Food Science and Technology**, New York, v. 4, n. 1, p. 16-21, 1993.

SPACKMAN, D. C.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of amino acids. **Biochemistry**, New York, v. 30, n. 7, p. 1190-1206, 1958.

SPIES, J. R. Determination of tryptofan in proteins. **Analytical Chemistry**, Arlington, v. 39, n. 12, p. 1412-1415, 1967.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of milk proteins. In: Fox, P. F. (Ed.). **Developments in dairy chemistry I. Proteins**. London: Applied Science Publishers, 1982. p. 1-59.

TANIMOTO, S. Y.; TANABE, S.; WATANABE, M.; ARAI, S. Enzymatic modification of zein to produce a non-bitter peptide fraction with a very high fischer ratio for patients with hepatic encephalopathy. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, n. 4, p.1119–1123, 1991.

TASSI, E. M. M. **Desenvolvimento de dietas para o desempenho físico. Comparação de oligopeptídios de α -lactalbumina com a proteína intacta como fonte protéico-energética no rato**. Campinas, SP: UNICAMP, 1996. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 1996.

TASSI, E. M.; AMAYA-FARFAN, J.; AZEVEDO, J. R. M. Hydrolysed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research**, New York, v. 18, n. 5, p. 875-881, 1998.

WALZEM, R. L. **Health enhancing properties of whey proteins and fractions**. Usdec/Applications Monograph, 1998. 108 p.

WATANABE, A.; OKADA, K. SHIMIZU, Y.; WAKABAYASHI, H.; HIGUCHI, K.; NIIYA, K.; KUMABARA, Y.; YASUYAMA, T.; ITO, H.; TSUKISHIRO, T.; KONODOH, Y.; EMI, N.; KOHORI, H. Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein (non-heated). **Journal of Medicine**, Basel, v. 31, n. 5-6, p. 283-302, 2000.

WONG, C. W.; SEOW, H. F.; LIU, A. H.; HUSBAND, A. J.; REGESTER, G. O.; WATSON, D. L. Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 56, n. 1-2, p. 85-96, 1997.

WU, G.; FANG, Y-Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and the implications for health. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.

XU, R. J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. **Food Research International**, Ottawa, v. 14, n. 1, p. 1-16, 1998.

CAPITULO 4

PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS FISIOLÓGICAS DE ALGUMAS FÓRMULAS PARA A NUTRIÇÃO INFANTIL À BASE DE PROTEÍNAS DE LEITE BOVINO – COMPARAÇÃO COM PRODUTO COMERCIAL DE USO SIMILAR.

RESUMO

Neste capítulo fez-se uma avaliação nutricional, estímulo à síntese hepática de glutathione e do estímulo primário à produção de imunoglobulina M (IgM) em células de baço. Quatro tipos de dieta foram utilizados no estudo, contendo 12% de proteína. Dieta com concentrado protéico de soro de leite (CSD), com caseína micelar (CM), com a mistura 50:50 CSD/CM e uma fórmula comercial (FC) tomada como referência. Para a avaliação imunológica utilizaram-se camundongos da linhagem A/Uni, com idade entre 6 e 8 semanas, imunizados com hemáceas de carneiro e utilização da técnica de contagem de células de baço formadoras de placa (CFP), em que o número de CFP era determinado em microscópio de fase com auxílio de uma lupa e para a massa toda do órgão (CFP/Baço). A dieta CSD não diferiu da dieta FC quanto ao número de CFP no baço, sendo estatisticamente superior ao da dieta CM e CSD/CM. Esta última não diferiu da dieta comercial (FC). A concentração hepática de glutathione não diferiu entre CSD e FC. Foi a mais baixa para CM, não havendo diferença estatística entre FC x CSD/CM e entre FC x CSD. Esses resultados reforçam a opinião corrente na literatura de que os preparados de proteínas de soro (WPC ou WPI) apresentam o mais elevado poder imunoestimulante entre todas as proteínas alimentícias já testadas sob esse aspecto. Os indicadores de valor nutricional (ganho de peso, PER, Dap, VBap e BN) não apresentaram diferença estatística entre as quatro dietas estudadas.

4.1 INTRODUÇÃO

O leite é um dos mais antigos dos alimentos funcionais disponíveis aos mamíferos após o nascimento, para a nutrição e função imune (MARSHALL, 2004). O leite, produto de secreção das glândulas mamárias, é um fluído viscoso formado de uma fase líquida (dispersante) e de partículas em suspensão (fase dispersa), formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração (SGARBIERI, 2004). Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 1997).

O leite bovino é a matéria prima para as indústrias de laticínios e alimento de grande valor nutritivo, sendo recomendado o seu consumo diário, devendo, assim, merecer atenção especial e um controle da qualidade higiênico-sanitário adequado (DONATELE; VIEIRA; FOLLY, 2003). A produção de leite em boas condições higiênicas deve ser uma das principais metas de todos os profissionais que atuam, direta ou indiretamente nesta área, visando proporcionar um alimento de alto valor nutritivo, e com reduzido risco de veicular agentes nocivos à saúde do consumidor (ARAÚJO, 1994; PINNA; LIZIEIRE, 2000).

O leite tem sido considerado como o alimento “mais próximo da perfeição”. Seu excepcional valor nutritivo é devido aos seus principais constituintes: proteínas, carboidratos, gordura, sais minerais, vitaminas e água (GUIMARÃES, 2002).

Os componentes do leite bovino são a água (87,20%), a lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%) e minerais (0,72%). As partículas suspensas na fase líquida do leite são gotículas de gorduras e micelas de caseína. O leite bovino é comercializado em sua forma líquida, integral ou desengordurado, pasteurizado ou esterilizado, desidratado ou não (SGARBIERI, 2004).

O leite bovino é reconhecido como uma importante fonte de alimento funcional inclusive pelas suas frações protéicas. Somente nas últimas décadas incentivaram-se pesquisas sobre a utilização do leite na promoção da saúde. Há

evidências de que o leite bovino contém inúmeros componentes com atividades biológicas que potencializam o efeito sobre a resposta imune e a resistência dos indivíduos às infecções (BRINK, 2002; SGARBIERI, 1999; WALZEM, 1999).

O perfil de aminoácidos apresentado pelas proteínas de soro de leite permite que sejam recomendadas para a formulação de vários produtos especiais, tais como fórmulas infantis (DIAS, 2004; AUGUSTIN; MUNÕS, 2006); desempenho do metabolismo muscular, pelo alto teor de aminoácidos essenciais de cadeias ramificadas como leucina e isoleucina, considerados importantes para o desempenho de esportistas (STEELE; HARPER, 1990); na recuperação de traumas múltiplos e de queimaduras (ALEXANDER; GOTTSCHLISH, 1990).

Tem sido sugerido que algumas propriedades funcionais das proteínas ou peptídios do leite bovino possam ser utilizadas no tratamento e/ou na prevenção de importantes condições patológicas (McINTOSH et al., 1998; PARODI, 1998; SGARBIERI 1999; MATSUMOTO et al., 2001). Há referências na literatura italiana do século XVII de que este alimento era utilizado por muitas culturas e sociedades para prevenir e tratar doenças, afirmando sua funcionalidade fisiológica (McINTOSH et al., 1998).

Sabe-se que as aplicações do soro de leite em fórmulas infantis, dietas especiais, produtos de panificação, lácteos e misturas em pó são indícios de que sua utilização tende a ampliar-se na indústria de alimento, ocasionando, consequente aumento na demanda e diversificação do uso (SIQUEIRA et al., 2002).

4.2 Objetivos

- Avaliar o efeito de proteínas da dieta na resposta imune primária (IgM) com camundongos da linhagem A/Uni.
- Verificar as concentrações de glutathiona em fígados de camundongos A/Uni, submetidos a dietas com diferentes componentes protéicos.

- Preparar e testar em ratos, do ponto de vista nutricional e do estímulo imunológico, formulações para alimentação infantil (faixa etária 6-24 meses), comparando com um produto comercial (FC) de mesmo uso.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Obtenção de matéria-prima

O concentrado protéico de soro doce (CSD) foi produzido em planta piloto do Tecnolat, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP, conforme metodologia apresentada no capítulo 2 (BORGES et al., 2001). A caseína micelar (CM) utilizada foi produzida por microfiltração, de acordo com processamento descrito no capítulo 2 (ROMAN, 2002). A caseína comercial foi obtida da MCassab, São Paulo, SP. A FC foi adquirida no comércio local.

4.3.2 Caracterização dos concentrados protéicos desidratados

♦ Composição centesimal

- **Nitrogênio Total:** determinado pelo método microKjeldahl, segundo método descrito na AOAC (1990). A proteína bruta foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38.
- **Umidade e sólidos totais:** foram determinados de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990). Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento e pesagem do resíduo sólido.
- **Resíduo mineral (cinza):** determinado de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990). Baseia-se na determinação do resíduo inorgânico que fica depois de calcinar a matéria orgânica de uma amostra.

- **Lipídios Totais:** determinados pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água determinado gravimetricamente após eliminação do solvente.

- **Lactose:** a determinação de lactose foi feita de acordo com metodologia de Acton (1977).

♦ **Determinação de aminoácidos**

A composição em aminoácidos, com exceção do triptofano, foi realizada em hidrólise ácida, seguindo o método de Spackman, Stein e Moore (1958), com algumas modificações. Pesaram-se 25mg de proteína da amostra que foram hidrolisados com 10mL de HCl 6N em tubos de hidrólise, selados à vácuo, e mantidos à temperatura de 110°C por 22 horas. Após incubação, o ácido clorídrico foi evaporado e a amostra foi recuperada em tampão citrato de sódio pH 2,2 (Diluyente marca Pickering, USA). Uma alíquota de 25µL foi injetada em analisador Dionex DX-300 para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina (marca Pickering), usando-se como referência, para identificação e cálculo, uma solução padrão de aminoácidos (marca Pierce, USA). O triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado após hidrólise enzimática com pronase (100mg/10mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5) a 40°C por 24 horas, seguido de reação colorimétrica com solução de 4-dimetilamino benzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,2N e leitura de absorbância a 590nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão (SPIES, 1967).

♦ **Escore de Aminoácidos Essenciais (EAE)**

Calculado relacionando-se a concentração de cada um dos aminoácidos essenciais dos concentrados protéicos em estudo com os aminoácidos correspondentes ao padrão de referência da FAO/WHO (1990), definindo-se como

EAE o menor quociente individual encontrado para os aminoácidos essenciais (HENLEY; KUSTER, 1994). Os quocientes obtidos indicam a ordem dos aminoácidos limitantes e o valor encontrado para o mais limitante, é uma estimativa do valor nutritivo da proteína em relação à referência (SGARBIERI, 1996).

4.3.3 Ensaios biológicos

a) Ensaio com camundongos

Utilizou-se em cada tratamento oito camundongos machos isogênicos da linhagem A/Uni, de 6-8 semanas de idade, obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB) da Unicamp em Campinas, SP e transportados para o Biotério do ITAL, onde foram realizados os experimentos. Os animais foram separados em grupos e colocados em caixas plásticas próprias contendo, cada uma, oito camundongos. As caixas foram mantidas em uma sala climatizada e com controle de luminosidade de 12 horas claro e 12 horas escuro. A “cama” (maravalha) dos animais foi trocada duas vezes por semana e a água dos bebedouros, a cada dois dias. Já com os comedouros, as trocas das dietas eram feitas diariamente. O delineamento experimental encontra-se descrito no protocolo 1 apresentado na figura 1.

b) Ensaio biológico com ratos

Para efetuar a avaliação nutricional das formulações utilizadas, realizou-se ensaio biológico com o delineamento experimental apresentado na figura 2. Utilizaram-se 40 ratos machos Wistar recém-desmamados, mantidos em dieta durante 28 dias. Após adaptação, os ratos foram distribuídos em quatro grupos experimentais, de maneira que não houvesse diferença nas médias de peso entre os grupos, sendo aleatoriamente designados aos tratamentos. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, sendo verificado o consumo de

dieta e coletadas fezes e urina, durante 10 dias após os quais foram mantidos nas dietas até que se completassem 21 dias. Dietas e água foram fornecidas “ad libitum”. Os bebedouros foram higienizados a cada dois dias e o controle da ingestão das dietas foi efetuado mediante pesagem sistemática

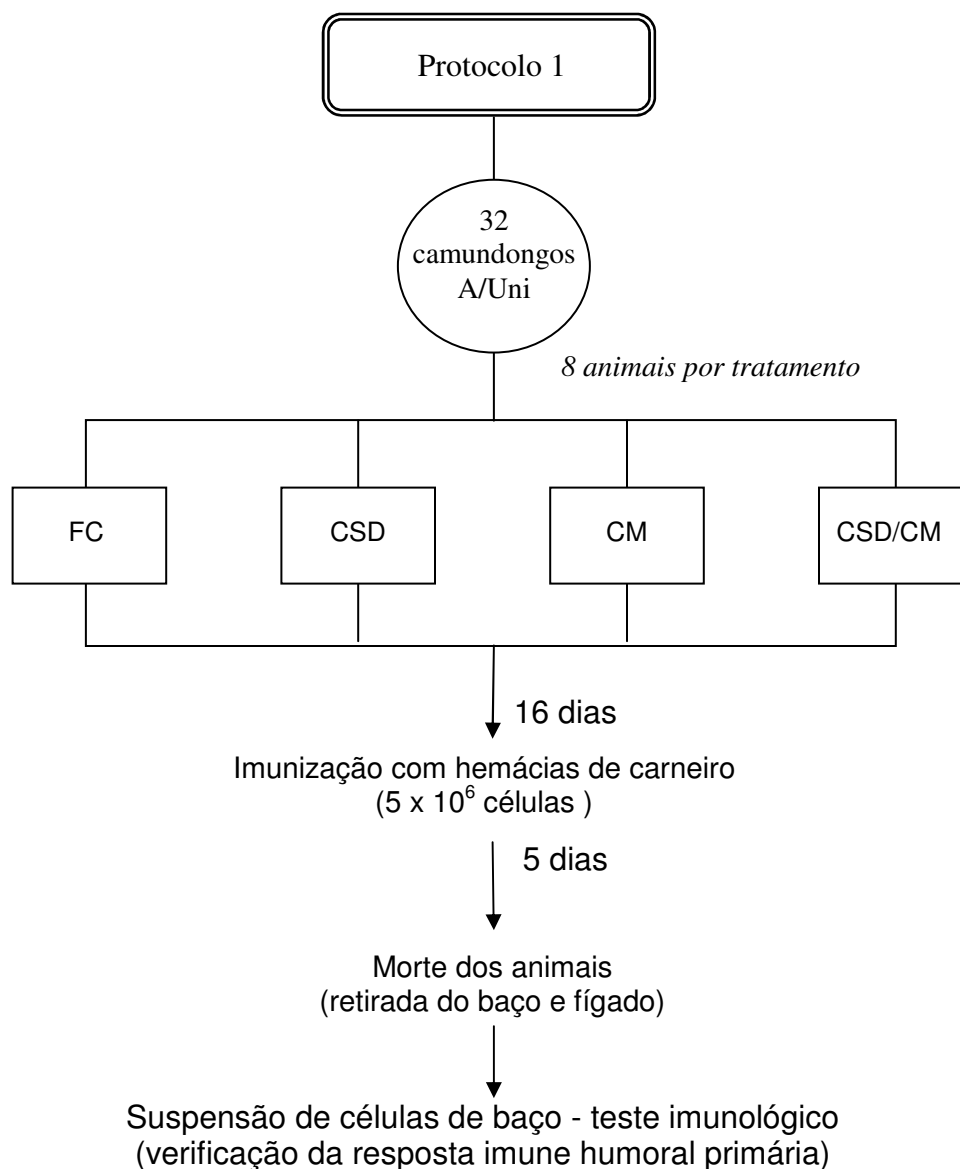


Figura 1 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos da linhagem A/Uni alimentados com dietas contendo 12% de proteínas, a saber: FC (produto comercial); CSD (concentrado protéico de soro doce); CM (caseína micelar); CSD/CM (50:50 p/p).

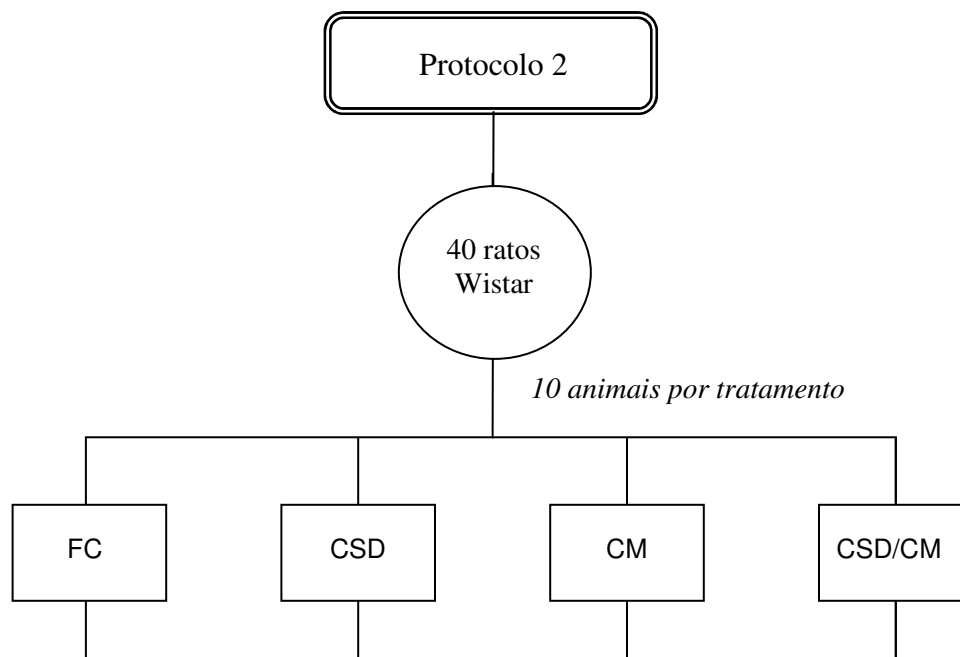


Figura 2 - Protocolo experimental para ensaio de avaliação nutricional efetuado com ratos Wistar recém-desmamados alimentados durante 28 dias com dietas contendo 12% de proteínas, a saber: FC (produto comercial); CSD (concentrado protéico de soro doce); CM (caseína micelar); CSD/CM (50:50 p/p).

c) Dietas experimentais

A FC é um produto disponível comercialmente, indicado pelo fabricante para casos de desnutrição, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), câncer, pré e pós operatório, perda de peso e suplementação oral, sendo utilizado neste ensaio como controle. As dietas experimentais foram formuladas com base na composição do produto comercial exceto pelas proteínas, utilizando como fontes protéicas o concentrado protéico de soro doce, a caseína micelar e uma mistura (50:50 p/p) em base protéica de concentrado protéico de soro doce e caseína micelar. A tabela 1 apresenta a composição das formulações. Cada dieta correspondeu a um tratamento de acordo com cada uma das fontes protéicas

anteriormente citadas. A determinação de proteínas das dietas foi feita pelo método micro Kjeldahl (A.O.A.C., 1990). As misturas vitamínica e mineral utilizadas encontram-se descritas na tabela 2. As misturas preparadas foram mantidas refrigeradas.

Tabela 1 – Composição das dietas utilizadas nos ensaios com camundongos da linhagem A/Uni e ratos Wistar.

Ingredientes	Dietas formuladas (g/kg)			
	CSD	CM	CSD/CM	FC
Maltodextrina	349,74	344,14	346,93	349,80
Sacarose	186,78	183,88	185,33	180,20
Fonte protéica	168,44	176,94	172,70 ²	174,96 ³
Óleo de girassol	75,03	75,03	75,03	75,03
Óleo de canola	45,75	45,75	45,75	45,75
Óleo de milho	12,81	12,81	12,81	12,81
TCM ¹	52,3	52,3	52,3	52,30
Lecitina de soja	9,15	9,15	9,15	9,15
Mistura de vitaminas*	50	50	50	50
Mistura de minerais*	50	50	50	50
Total	1000	1000	1000	1000

¹TCM = triglicerídios de cadeia média; ²84,24 de proteínas de soro de leite e 88,46 de caseína micelar; ³83,28g de proteínas de soro lácteo e 91,68 de caseinato de potássio. * MCassab, SP.

Tabela 2 – Composição das misturas de vitaminas e minerais (MCassab, SP) utilizadas para ensaio com camundongos da linhagem A/Uni.

Componentes das misturas	Quantidade (g/kg)
Vitaminas	
Vitamina A	0,9333
B-caroteno	1,6800
Vitamina D (100.000 UI/g)	0,3760
Vitamina E (50%)	1,8400
Vitamina K	0,0038
Vitamina C	7,4000
Vitamina B ₁	0,0560
Vitamina B ₂	0,0740
Niacina	0,5600
Vitamina B ₆	0,0740
Ácido Fólico	0,0186
Ácido Pantoténico	0,2800
Vitamina B ₁₂ (0,1%)	0,1400
Biotina	0,0014
Citrato de Colina (35%)	68,5714
Taurina	7,4000
L-carnitina	3,8000
Excipiente	906,7914
Nutrientes	93,2086
Minerais	
Cloreto de sódio	47,3114
Sulfato de potássio anidro	223,2142
Fosfato bicálcio anidro	283,67,34
Óxido de magnésio	19,6296
Sulfato ferroso dessecado	2,5614
Iodeto de potássio	0,0096
Sulfato de cobre anidro	0,1860
Sulfato de zinco monohidratado	2,6404
Sulfato de manganês monohidratado	0,1416
Selenito de sódio	0,0052
Molibdato de sódio dihidratado	0,0080
Dinicotinato de cromo 2,5%	0,0960
Excipiente	234,8176
Nutrientes	765,1838

4.3.4 Monitoramento do efeito imunomodulador

Refere-se ao ensaio biológico efetuado com camundongos.

- ♦ **Imunização para teste imunológico** – Cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 5×10^6 hemácias de carneiro lavadas em tampão borato 0,05M (adicionado de sais de cálcio e magnésio). As hemácias foram obtidas em solução de Alséver do Biotério Boa Vista, Campinas, SP.

- ♦ **Ensaio imunológico para contagem de células formadoras de placas (CFP)**
– Após 16 dias recebendo a dieta, os animais foram imunizados com 5×10^6 hemácias de carneiro lavadas em tampão borato. A contagem de CFP foi efetuada de acordo com o método modificado de Cunningham e Szenberg (1968). Os animais foram mortos 5 dias após a imunização quando, de acordo com a literatura e confirmado em testes laboratoriais, acontece o pico de resposta. Os baços foram retirados e alíquotas de suspensão de suas células foram colocadas a reagir com hemácias e complemento de cobaia, em lâminas tratadas com agarose. Após tempo previamente determinado a reação foi interrompida e a contagem de placas foi efetuada com auxílio de lupa (BOUNNOUS; GOLD, 1991).

- ♦ **Dosagem de glutatona** – Efetuada nos fígados dos ratos pelo método colorimétrico de Saville (1958) modificado, que mede a glutatona livre reduzida (GSH). Os órgãos foram coletados imediatamente após a morte dos animais, sendo congelados e triturados em nitrogênio líquido, ficando armazenados em nitrogênio até o momento da análise. Para a análise tomaram-se alíquotas de amostra de 0,1 a 0,2g. Adicionaram-se 5mL de ASS (ácido sulfosalicílico) precipitando assim as proteínas, e imediatamente a amostra foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos. Utilizaram-se 200μL do sobrenadante, e para a reação colorimétrica foram utilizados vários reagentes (A, B, C, D) que transformam os grupos sulfidrílo (SH) em ácido nitroso, catalisado por Hg^{2+} em

quantidade equimolar. Finalmente, o ácido nitroso reage com um reagente contendo sulfonilamida e outro contendo N-1-naftiletilenodiamina para formar o azo-cromóforo brilhante que é lido a 540nm, e quantificado com auxílio de uma curva-padrão de GSH.

4.3.5 Índices nutricionais

Foram avaliados nos ensaios efetuados com ratos, sendo verificados os seguintes índices: ganho de peso dos animais, balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (Dap), valor biológico aparente (VBap) e quociente de eficiência protéica (PER).

4.3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa “Statistica: Basic Statistics and Tables”. Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (GOMES, 1982).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Escore de Aminoácidos Essenciais (EAE)

Os perfis de aminoácidos essenciais dos concentrados protéicos produzidos em planta piloto (CSD e CM), uma caseína comercial (CC), e a formulação comercial (FC), comparados com o padrão teórico (FAO/WHO, 1990), estão na tabela 3.

Considerando a composição do soro em aminoácidos essenciais e os requerimentos para esses aminoácidos, verificou-se que soro de leite fornece quantidades significativas de isoleucina, lisina, cisteína, metionina e treonina.

As proteínas de soro contêm quantidades relativamente altas de aminoácidos de cadeia ramificada - BCAA (\cong 26%) (BOS; GAUDICHON; TOME, 2000; WALZEN; DILLARD; GERMAN, 2002), leucina, isoleucina e valina. Os BCAAs, em particular a leucina, constituem importantes fatores de reparo e crescimento tecidual (MARSHALL, 2004).

A leucina e outros aminoácidos essenciais desempenham papéis importantes na síntese protéica, como moléculas sinalizadoras para iniciação da síntese e como substratos para a síntese de novas proteínas (ANTONY et al., 2001; HÁ; ZEMEL, 2003). A disponibilidade intracelular de aminoácidos é um fator chave na síntese de proteína muscular embora concentrações extracelulares de aminoácidos sejam igualmente importantes (BOHE et al., 2003). As concentrações de aminoácidos do plasma aumentam após a ingestão de proteína ou de uma infusão de aminoácidos, enquanto as concentrações teciduais podem aumentar ou permanecer inalteradas (DANGIN et al., 2001; LEVENHAGEN et al., 2002).

As proteínas do leite promoveram maior aumento nas concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada nos tecidos periféricos quando comparadas com as proteínas de soja (FOUILLET et al., 2002) sugerindo que o perfil de aminoácidos ou outros componentes da dieta influenciam sua utilização. Estudos com animais e com humanos evidenciaram que uma proteína de baixa qualidade aumenta a perda de nitrogênio e limita a síntese protéica devido à ineficiente utilização de aminoácidos essenciais (HÁ; ZEMEL, 2003).

Outro ponto importante, além da composição de aminoácidos presentes no soro é a maneira pela qual as proteínas do soro e outras são absorvidas e utilizadas. As proteínas de soro são absorvidas mais rapidamente que as caseínas (BOIRIE et al., 1997; BOHE et al., 2001). As caseínas formam coágulos no estômago, aumentando a hidrólise péptica e retardando sua entrada no intestino delgado. As proteínas de soro não coagulam sob condições ácidas, sendo consideradas proteínas de digestão rápida, alcançando rapidamente o jejuno após entrarem no trato gastrintestinal. Após alcançarem o intestino delgado, a hidrólise das proteínas do soro é mais lenta do que a da caseína, seguida de maior absorção intestinal (MARSHALL, 2004).

Tabela 3 – Perfil de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) e escore químico (EAE) de concentrados protéicos obtidos de leite bovino, caseína micelar, caseína comercial e FC produto comercial, comparados com a referência da FAO/WHO.

Aminoácidos	CSD	CM	CC	FC	FAO/WHO
Treonina	7,6	4,62	4,1	6,41	3,4
Cisteína +Metionina	5,4	3,1	2,2*	4,36	2,5
Valina	5,0	6,38	6,2	6,92	3,5
Leucina	11,7	10,3	8,8	10,18	6,6
Isoleucina	6,3	4,95	4,6	6,86	2,8
Fenilalanina + Tirosina	7,2	11,05	9,9	9,11	6,3
Lisina	11,0	8,5	7,6	9,17	5,8
Histidina	6,1	3,03	2,8	2,33	1,9
Triptofano	1,1	1,43	1,4	1,80	1,1
EAE **	≥ 1,00	≥ 1,00	0,88 (Cys) ₂ + Met	≥ 1,00	-

Resultados médios de determinações feitas em duplicata. *Aminoácido mais limitante em relação ao padrão FAO/WHO (1990). CSD, concentrado protéico de soro; CC, caseína comercial; FC, produto comercial e, padrão FAO/WHO. **EAE (escore de aminoácidos essenciais).

Um padrão de absorção rápido foi favorável ao balanço de nitrogênio total e à utilização pós-prandial de proteínas, verificada em voluntárias idosas (ARNAL et al., 1999) embora outros estudos sejam necessários para melhor avaliar as vantagens e desvantagens nessa população (DANGIN, et al., 2001; ARNAL et al., 2000; MARSHALL, 2004).

No período pós-prandial, os principais reguladores do metabolismo protéico são a insulina e a disponibilidade de aminoácidos. A insulina age através da inibição da proteólise (BOIRIE et al., 2001) e estimulando a síntese de proteína muscular (BIOLO et al., 1999). A disponibilidade de aminoácidos é o principal fator regulador da oxidação e síntese protéica (VOLPI et al., 1998). É afetada pela

razão de digestão de proteína, o que pode explicar os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio no ganho protéico pós-prandial. Em indivíduos jovens, proteínas de digestão mais lenta como a caseína, induzem uma menor e mais prolongada hiperaminoacidemia e maior deposição pós-prandial de leucina do que proteínas de digestão mais rápida, como as proteínas do soro. O efeito verificado foi independente da composição aminoacídica das proteínas da dieta (DANGIN et al., 2001).

Proteínas do soro e a caseína afetam de modo diferente o ganho protéico durante o envelhecimento. Quando indivíduos idosos consumiram uma mistura dessas duas proteínas na refeição verificou-se maior utilização das proteínas de soro, mais rapidamente digeridas do que a caseína. As variações no perfil dos aminoácidos e/ou a disponibilidade de leucina são responsáveis por essa diferença. Contudo, a utilização de uma proteína de digestão mais rápida pode ser mais benéfica ao aumento do ganho protéico pós-prandial do que uma de digestão lenta podendo, conseqüentemente, limitar a perda de proteína corporal em indivíduos idosos (DANGIN et al., 2003).

As proteínas do soro de leite diferem das caseínas por apresentarem teores mais elevados dos aminoácidos treonina, aminoácidos sulfurados (metionina + cistina), leucina, isoleucina, lisina e triptofano e teores mais baixos dos aminoácidos de cadeias aromáticas (fenilalanina + tirosina). Em relação ao padrão teórico utilizado, as caseínas podem apresentar deficiências em aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) e/ou triptofano. Essa situação é refletida nos escores químicos, também apresentados na tabela 3, e que se apresentam iguais ou superiores a 1,0 para os concentrados de proteínas de soro e inferiores a 1,0 para as caseínas (SHAN, 2000).

4.4.2 Ensaios imunológicos e glutatona hepática

Os resultados verificados com ensaios efetuados com camundongos para dosagens de glutatona hepática estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações de glutathione (média \pm desvio padrão) medidas em fígados de camundongos da linhagem A/Uni, alimentados durante 21 dias com dietas contendo 10% de proteína.

Tratamentos	Glutathione $\mu\text{mol/g}$ tecido
FC	$6,85 \pm 0,83^{ab}$
CM	$5,54 \pm 0,28^c$
CSD	$8,02 \pm 0,59^a$
CSD/CM	$6,55 \pm 0,96^{bc}$

Tratamentos: FC (produto comercial); CM (caseína micelar); CSD (concentrado protéico de soro doce) e CSD/CM (50:50 p/p). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de glutathione hepática dos animais dos grupos CSD e FC. Os resultados obtidos com os animais alimentados com a mistura CSD/CM, utilizada como fonte protéica, foram inferiores àqueles obtidos para o CSD. Os piores resultados foram verificados com a CM como única fonte protéica.

Marshall (2004) reforçou dados disponíveis na literatura afirmando que as proteínas de soro, ricas em aminoácidos sulfurados cisteína e metionina, estão diretamente associadas à melhora da função imune através da elevação intracelular de glutathione. De fato, as formulações utilizadas nesta pesquisa (Cap. 3) contendo CSD apresentaram resultados melhores do que aquela utilizando CM como única fonte protéica. A formulação CSD/CM apresentou resultados na imunomodulação semelhantes àqueles verificados com o produto disponível comercialmente.

Vários estudos afirmam que a cisteína é o aminoácido limitante da síntese de glutathione em humanos e animais (LIONS et al., 2000; JAHOOR et al., 1999). O aumento do suprimento de cisteína ou de seus precursores via administração oral ou intravenosa aumenta a síntese de glutathione e previne sua deficiência em

humanos e animais em várias condições nutricionais e patológicas, incluindo desnutrição protéica, síndrome respiratória em adultos e AIDS (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003; WU et al., 2004).

Contudo, em virtude da baixa eficácia da cisteína livre e de sua toxicidade, a partir de certa concentração, alguns compostos menos tóxicos e mais eficazes que a cisteína livre (N-acetil cisteína, L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato e metionina), têm sido usados para repor os déficits de glutathione em condições fisiológicas e ou patológicas específicas. Sabe-se que dietas deficientes em proteínas impõem um decréscimo nos níveis teciduais de glutathione e um aumento dos radicais livres de oxigênio (ROS), aumentando também o risco de infecções oportunistas. Por outro lado, dietas com elevado teor protéico, fornecidas no início do período de reabilitação, poderão promover estresse metabólico, levando a efeitos adversos (LI et al., 2002).

O uso de N-acetil cisteína, L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato e metionina com objetivo de restaurar os níveis de glutathione e, dessa forma equilibrar o estado redox, sem ter que submeter os indivíduos a uma dieta hiperprotéica, tem sido sugerido por alguns autores. Contudo, são compostos que elevam os custos das dietas e/ou suplementos não deixando ainda de apresentar efeitos colaterais. A restauração dos níveis de glutathione e o balanço de óxido-redução, sem ter que usar níveis elevados de proteína na dieta, constitui uma estratégia terapêutica adjuvante, importante durante os estágios iniciais de reabilitação da desnutrição protéica ou outra síndrome que ocasione uma deficiência acentuada de glutathione no organismo. Para esta condição, a dietoterapia com proteínas de soro de leite, não desnaturadas, parece ser a melhor alternativa (LI et al., 2002).

Experimento similar ao desta tese foi realizado na Nova Zelândia (RUTHERFURD et al., 2005) utilizando camundongos BALB/c que receberam dietas, nutricionalmente balanceadas, para atender as necessidades de crianças na faixa de 1 a 3 anos, durante quatro semanas. As fontes protéicas utilizadas foram o leite em pó integral adicionado ou não de IMUCARE, um concentrado protéico de soro de leite (10,5 g/100 g de dieta). As dietas foram formuladas com 20% de proteína. A dieta contendo o IMUCARE promoveu maior proliferação

celular (células de baço), maior fagocitose (células sanguíneas) e maior produção de anticorpos por linfócitos intestinais. Os autores concluíram que o IMUCARE produziu impacto em várias funções do sistema imune, mesmo quando incorporado em dietas complexas de composição realística para uso em nutrição infantil.

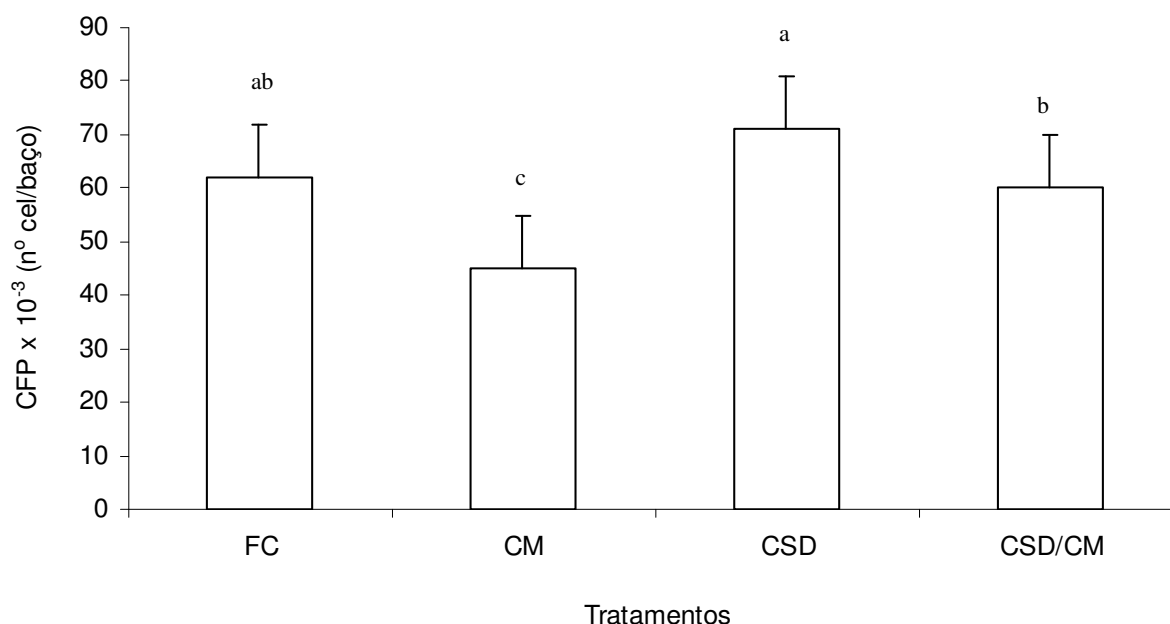


Figura 3 – Resposta imune humoral verificada com camundongos isogênicos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína, a saber: FC (produto comercial); CM (caseína micelar); CSD (concentrado protéico de soro doce) e CSD/CM (50:50 p/p). CFP (células formadoras de placas). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resposta similar entre os tratamentos obtida para os níveis de glutathione hepática foi verificada na resposta imune humoral, conforme valores apresentados na figura 3 e na tabela 5. Os resultados obtidos com os animais dos grupos FC e CSD não diferiram estatisticamente entre si, enquanto a CM foi o tratamento que

apresentou o pior resultado (44.400 células formadoras de placa/baço). As respostas verificadas com o tratamento CSD/CM (50:50 p/p) foram maiores (57.120 CFP/baço) do que obtidas com dieta 100% CM, o que justifica o potencial imunomodulador verificado para o CSD (69.860 CFP/baço).

Tabela 5 - Resposta imune humoral (média \pm desvio padrão) verificada com camundongos isogênicos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína.

Tratamentos	CFP/baço $\times 10^{-3}$
FC	62,05 \pm 3,84 ^{ab}
CM	44,40 \pm 2,86 ^c
CSD	69,86 \pm 6,24 ^a
CSD/CM	57,12 \pm 4,28 ^b

Tratamentos: FC (produto comercial); CM, caseína micelar; CSD, concentrado protéico de soro doce; CSD/CM, concentrado protéico de soro doce/caseína micelar (50:50 p/p). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A figura 4 apresenta a forte correlação positiva (próxima a 1) verificada entre os valores de glutatona hepática e CFP.

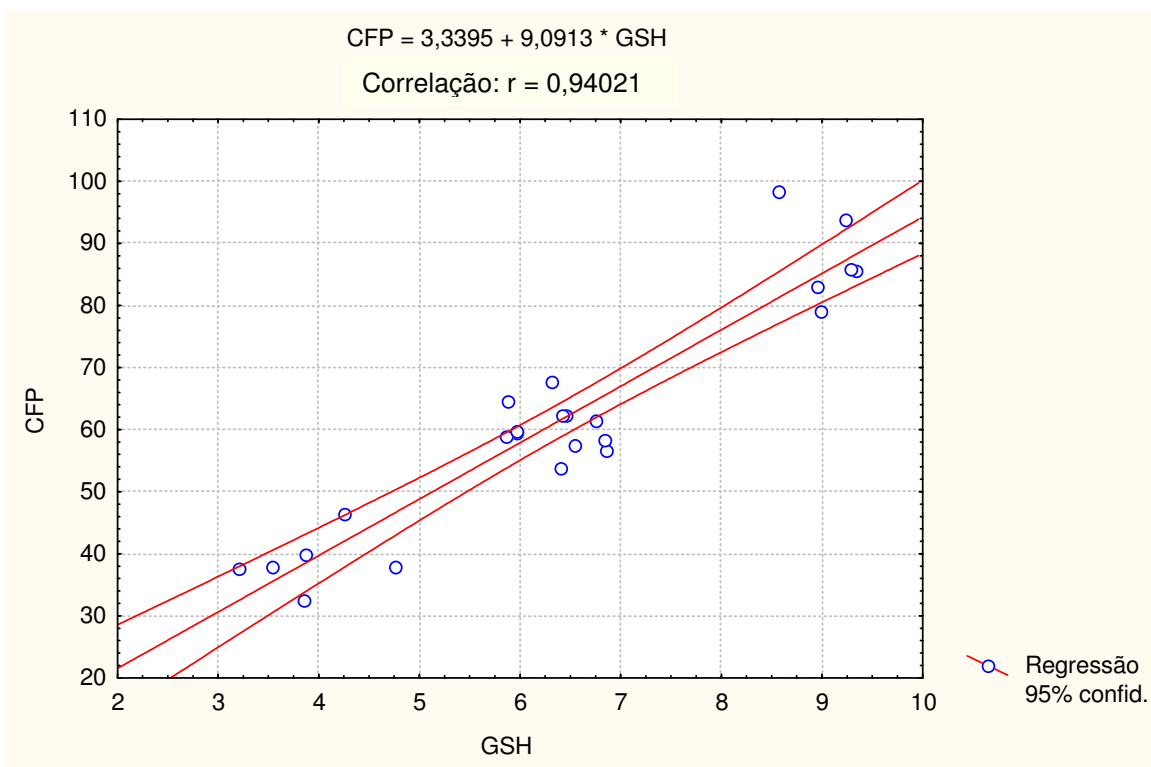


Figura 4 - Correlação linear entre os resultados de CFP (células formadoras de placas) e glutathiona hepática (GSH), obtida com camundongos da linhagem A/Uni, alimentados com dietas contendo 10% de proteína ($p < 0,05$).

4.4.3 Avaliação nutricional

O aspecto saudável dos animais mostrou que tanto o estado de saúde como o manejo dos animais foram eficientes e que a natureza das proteínas na dieta, não modificou aparentemente a saúde dos mesmos. Os valores obtidos de ganho de peso, consumo de dieta e quociente de eficiência alimentar encontram-se na tabela 6 enquanto os resultados dos índices nutricionais avaliados são apresentados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 6 - Ganho de peso, consumo de dieta (g) e quociente de eficiência alimentar (QEA) em ratos machos Wistar, em crescimento, submetidos a diferentes dietas (média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Ganho de peso (g)	Consumo de dietas (g)	QEA
FC	154,17 \pm 15,07 ^a	400,07 \pm 24,82 ^a	0,38 \pm 0,019 ^a
CM	152,33 \pm 13,06 ^a	451,42 \pm 63,20 ^a	0,34 \pm 0,038 ^a
CSD	169,97 \pm 14,18 ^a	453,38 \pm 43,63 ^a	0,38 \pm 0,034 ^a
CSD/CM	162,92 \pm 13,42 ^a	449,54 \pm 45,61 ^a	0,36 \pm 0,024 ^a

Tratamentos: FC (produto comercial); CM (caseína micelar); CSD (concentrado protéico de soro doce) e CSD/CM (50:50 p/p). Valores com letras iguais (colunas) não apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para ganho de peso, consumo de dieta e quociente de eficiência alimentar, entre os tratamentos. O mesmo se verificou para os índices nutricionais (tabela 7).

As proteínas do soro apresentam propriedades fisiológicas importantes, sendo melhor fonte de energia e de aminoácidos quando comparadas às proteínas do ovo, carne, soja e caseína (SGARBIERI et al., 2000). Qualquer fator que altere a digestibilidade das proteínas poderá afetar seu valor nutricional e dentre os fatores que determinam a qualidade nutricional das proteínas encontram-se a digestibilidade, a composição de aminoácidos e a biodisponibilidade. A excelente eficiência nutricional das proteínas do soro de leite é responsável pelo alto valor biológico conferido a estas proteínas (FRIEDMAN, 1996).

Tabela 7 - Digestibilidade aparente (Dap), valor biológico aparente (VBap) e balanço de nitrogênio (BN) em ratos machos da linhagem Wistar, alimentados com dietas contendo 10% de proteína (média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Dap (%)	VBap (%)	BN(g)
FC	96,25 \pm 2,05 ^a	92,24 \pm 2,21 ^a	1,35 \pm 0,36 ^a
CM	97,93 \pm 1,28 ^a	92,91 \pm 2,94 ^a	1,38 \pm 0,09 ^a
CSD	95,96 \pm 1,34 ^a	90,03 \pm 2,98 ^a	1,28 \pm 0,26 ^a
CSD/CM	96,63 \pm 1,90 ^a	90,40 \pm 4,26 ^a	1,33 \pm 0,42 ^a

Tratamentos: FC (produto comercial); CM (Caseína micelar); CSD (Concentrado protéico de soro doce) e CSD/CM (50:50 p/p). Valores com letras iguais (colunas) não apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os métodos biológicos mais utilizados para determinar a qualidade protéica ao longo dos anos tem sido o PER e o VB. O PER utiliza animais em crescimento e avalia ganho de peso por grama de proteína ingerida. O valor biológico (VB) estima o nitrogênio retido em função do absorvido levando em conta respectivamente a utilização metabólica e a digestibilidade. As principais críticas a esses métodos são baseadas nas diferenças no requerimento de aminoácidos entre ratos e seres humanos, uma vez que em humanos o processo de manutenção predomina sobre o crescimento e, por outro lado, os requerimentos por aminoácidos sulfurados são maiores em ratos que em humanos (MUGHAN, 2005; SCHAAFSMA, 2005). A tabela 8 apresenta os resultados do quociente de eficiência protéica (PER) obtidos com ratos machos da linhagem Wistar.

Tabela 8 - Resultados do quociente de eficiência protéica (PER) obtidos com ratos machos da linhagem Wistar (média \pm desvio padrão), alimentados com diferentes dietas (fontes protéicas).

Tratamentos	PER
FC	3,13 \pm 0,16 ^a
CM	2,78 \pm 0,31 ^a
CSD	3,06 \pm 0,27 ^a
CSD/CM	2,96 \pm 0,2 ^a

Tratamentos: FC (produto comercial); CM (caseína micelar); CSD (concentrado protéico de soro doce) e CSD/CM (50:50 p/p). Valores com letras iguais (colunas) não apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de PER obtidos para as proteínas avaliadas nesta pesquisa, sendo semelhantes àqueles descritos na literatura.

O valor nutricional de uma proteína (ou de uma fonte protéica) é definido por sua capacidade de suprir os requerimentos com relação ao nitrogênio total e aminoácidos. A qualidade refere-se à intensidade de utilização dos aminoácidos da dieta para a síntese protéica (MUGHAN, 2005). Não é muito fácil conceituar a qualidade protéica. A qualidade nutricional das proteínas de soro de leite é inquestionável. Essa qualidade depende de sua composição em aminoácidos e de sua digestibilidade, da composição da dieta, da saúde e do estado fisiológico e nutricional do animal que a consome. Outro fator complicador é a habilidade que os animais têm para reutilizar os aminoácidos na síntese protéica (SWAISGOOD, 1996; ANTUNES, 2003).

Os requerimentos nutricionais de aminoácidos e de proteínas são usualmente expressos como ingestão total, sem levar em conta o fato de que nem todos os aminoácidos presentes na dieta podem ser absorvidos e utilizados. O conceito de biodisponibilidade para um nutriente, incluindo aminoácidos e outros

componentes dos alimentos expressa a proporção do total, no caso de aminoácidos presentes na dieta, que pode ser absorvida e utilizada metabolicamente. A biodisponibilidade refere-se a três componentes: digestibilidade, integridade química e ausência de interferências metabólicas (MALCOLM; FULLER; TOMÉ, 2005). Do ponto de vista prático, o aspecto mais importante da biodisponibilidade de aminoácidos e proteínas é sua digestibilidade, referindo-se a sua utilização no sistema digestório, embora os outros dois componentes sejam também importantes para certos alimentos e métodos de processamento. Assim, modificação na estrutura química dos aminoácidos, como pode ocorrer após tratamento térmico afeta a sua disponibilidade (SCHAAFSMA, 2000).

Com relação a outras utilizações para os componentes do soro, os aminoácidos, minerais, lipídios e proteínas biologicamente ativas podem ser utilizadas em nutrição clínica. O suporte protéico adequado é essencial à recuperação pós-cirúrgica e as proteínas de soro podem exercer este efeito. Os processos cirúrgicos são estressantes, debilitam o organismo alterando as defesas naturais podendo levar a possíveis complicações pós-cirúrgicas (MACKAY; MILLER, 2003). Pesquisas demonstraram que a utilização de lactoferrina regula a resposta imunológica exercendo efeitos protetores em pacientes pós-cirúrgicos (ZIMECKI et al., 2001).

Estudos efetuados com humanos demonstraram que as proteínas de soro melhoram a função cognitiva em indivíduos em nível de estresse elevado (MARKUS; OLIVIER; HAAN, 2002). Considera-se que o nível de serotonina melhora a adaptação ao estresse e estudos propõem que o triptofano disponível no soro de leite pode ser usado como substrato para aumentar os níveis de serotonina cerebrais. Nesses estudos os indivíduos receberam proteínas de soro enriquecidas com α -lactalbumina devido às suas concentrações elevadas de triptofano (MARSHALL, 2004).

Pacientes com doenças crônicas ou agudas podem ser beneficiados pela utilização de proteínas de soro contendo imunoglobulinas, lactoglobulinas e BSA, capazes de aumentar a imunidade, o que torna bastante interessante o uso de

proteínas de soro por indivíduos com câncer ou AIDS. Por outro lado, os aminoácidos de cadeia ramificada encontrados nas proteínas do soro são prontamente utilizados pelo músculo para fornecimento de energia sob condições de estresse, sendo importantes para atletas, para pacientes desnutridos ou com dieta restrita em proteína como ocorre com o doente renal em fase terminal (BELL, 2000).

Os aminoácidos de cadeias ramificadas (ACR) contidos nas proteínas do soro exercem vários benefícios aos atletas, ajudando a minimizar as perdas musculares sob condições de maior catabolismo protéico promovido sob exercício intenso como aquelas que ocorrem com maratonistas (BLOMSTRAND; NEWSHOLME, 1992; GERMAN; DILLARD; WALZEN, 2001).

4.5 CONCLUSÃO

Os resultados, tanto os de natureza nutricional como os de estimulação imunológica, não diferiram entre o produto comercial, e as formulações contendo CSD ou CSD/CM, confirmando resultados da literatura que mostram elevado valor nutritivo e poder imunoestimulante das proteínas do soro de leite, ao contrário da CM que, apesar do elevado valor nutritivo, apresentou poder imunoestimulante inferior, fato também demonstrado na literatura, para as caseínas comerciais. Conclui-se também que o produto comercial testado apresentou elevado valor nutritivo e imunoestimulador da produção de IgM pelas células do baço frente ao antígeno específico de eritrócitos de carneiro (SRBC).

Os animais que receberam os tratamentos CSD e FC apresentaram concentrações similares de glutatona hepática. O tratamento CSD/CM corresponde a uma formulação desenvolvida com as mesmas características do FC, apresentando o mesmo perfil de resposta, o que indica que a formulação desenvolvida poderia ser comercializada com as mesmas indicações de uso do produto comercial.

Os tratamentos que continham CSD como única fonte protéica ou como parte de uma mistura com a CM apresentaram maior efeito imunomodulador

conforme verificado por meio do teste de CFP, o que denota o efeito modulador das proteínas de soro sobre o sistema imune de camundongos, tendo em vista que o tratamento que continha somente a CM como fonte protéica, apresentou resultados inferiores.

Todas as formulações avaliadas neste estudo apresentaram a mesma qualidade nutricional, no que concerne ao ganho de peso, consumo de dieta e quociente de eficiência alimentar. O mesmo se verificou para os outros índices nutricionais avaliados. Estes resultados confirmam dados da literatura que conferem o efeito melhorador da resposta imune atribuído às estruturas primárias e terciárias e ao perfil de aminoácidos apresentados pelas proteínas de soro de leite.

4.6 REFERÊNCIAS

ACTON, G. H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 9, n. 3, p. 111-114, 1977.

ALEXANDER, J. W.; GOTTSCHLISH, M. M. Nutritional immunomodulation in burned patients. **Critical Care in Medicine**, New York, v. 18, n. 2, p. S149-153, 1990.

ANTONY, J. C.; ANTONY, T. G.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131(suppl.), p. 856S-860S, 2001.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas de soro de leite bovino**. Barueri: Manolo, 2003. 135p.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemistry**, 15th ed., Washington D.C., 1990, 1141 p.

ARAUJO, W. P. **Contribuição físico-química, celular e microbiológica do leite tipo A, B e especial, colhidos de vacas criadas no estado de São Paulo: Contribuição à semiologia da glândula mamária**. São Paulo, SP. Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1994. 54p. (Tese de livre Docência).

ARNAL, M. A.; MOSONI, L.; BOIRIE, Y.; HOULIER, M. L.; MORIN, L.; VERDIER, E.; RITZ, P.; ANTOINE, J. M.; PRUGNAUD, J.; BEAUFRERE, B.; PATUREAU MIRAND, P. Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. **American Journal of Clinical and Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 6, p. 1202-1208, 1999.

ARNAL, M. A.; MOSONI, L.; BOIRIE, Y.; HOULIER, M. L.; MORIN, L.; VERDIER, E.; RITZ, P.; ANTOINE, J. M.; PRUGNAUD, J.; BEAUFRERE, B.; PATUREAU MIRAND, P. Protein feeding pattern does not affect protein retention in young women. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 7, p. 1700-1704, 2000.

AUGUSTIN, O. M.; MUNÓZ, E. M. V. Proteins and peptides enteral nutrition. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 21 (Supl. 2), p. 1-13, 2006.

BELL, S. J. J. Whey protein concentrates with and without immunoglobulins: a review. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2000.

BIOLO, G.; WILLIAMS, B. D.; FLEMING, R. Y.; WOLFE, R. R. Insulin action on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. **Diabetes**, New York, v. 48, n. 5, p. 949-957, 1999.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BLOMSTRAND, E.; NEWSHOLME, E. A. Effect of branched-chain amino acid supplementation on the exercise induced change in aromatic amino acid concentration in human muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 146, n. 3, p. 293-298, 1992.

BOHE, J.; LOW, A.; WOLFE, R. R.; RENNIE, M. J. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. **Journal of Physiology**, Bristol, v. 552, n. 1, p. 315-324, 2003.

BOHE, J.; LOW, J. F.; WOLFE, R. R. RENNIE, M. J. Latency and duration of stimulation of human muscle protein synthesis during continuous infusion of amino acids. **Journal of Physiology**, Bristol, v. 532, n. 2, p. 575-579, 2001.

BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M. P.; MAUBOIS, J. L.; BEAUFRERE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceeding of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 94, n. 26, p. 14930-14935, 1997.

BOIRIE, Y.; GACHON, P.; CORDAT, N.; RITZ, P.; BEAUFRÈRE, B. Differential insulin sensitivities of glucose, amino acid, and albumin metabolism in elderly men and women. **Journal Clinical Endocrinology and Metabology**, Bethesda, v. 86, n. 2, p. 638-644, 2001.

BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; PEREIRA DIAS, N. F. G.; JACOBUCCHI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

BOS, C.; GAUDICHON C.; TOME, D. Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. **Journal of American College of Nutrition**, New York, v. 19, n. 2, p. 191S-205S, 2000.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

BRASIL. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos n.s; 1255, de 25 de junho de 1962, n. 1236 de 02 de setembro de 1994, n. 1812 de 08 de fevereiro de 1996 e n. 2244 de 04 de junho de 1997. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Brasília/DF-1997.

BRINK, W. The faces of whey. **Life Extension Report**, Life Extension Foundation, Scottsdale, 2002. p. 43-48.

CUNNINGHAM, A.; SZENBERG, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. **Immunology**, Buenos Aires, v. 14, n. 4, p. 599-600, 1968.

DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENAS, C.; GACHON, P.; FAUQUANT, J.; CALLIER, P.; BALLEVRE, O.; BEAUFRERE, B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of post-prandial protein retention. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 280, p. E340-E348, 2001.

DANGIN, M.; GUILLET, C.; GARCIA-RODENAS, C.; GACHON, P.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; REIFFERS-MAGNANIT, K.; FAUQUANT, J.; BALLÈVRE, O.; BEAUFRÈRE, B. The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. **Journal of Physiology**, Paris, v. 549, n. 2, p. 635-644, 2003.

DIAS, N. F. G. P. **Propriedades imunoestimulatórias e anti-tumoral de concentrados protéicos de soro de leite bovino, de caseína e de um isolado protéico de soja**. Campinas, SP: UNICAMP, 2004. 149p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2004.

DONATELE, D. M.; VIEIRA, L. F. P.; FOOLY, M. M. Relação do teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite "in natura" de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 95-100, 2003.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization on the United Nation/World Health Organization. **Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation**, Bethesda: FAO/WHO, 1990. 66 p.

FOUILLET, H.; MARIOTTI, F.; GAUDICHON, C.; BOS, C.; TOME, D. Peripheral and splanchnic metabolism of dietary nitrogen are differently affected by the protein source in humans as assessed by comportmental modeling. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 125-133, 2002.

FRIEDMAN, M.; Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 44, n. 1, p. 6-29, 1996.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J.; WALZEM, R. E. **U. S. Whey products and dairy ingredients for health**: a review. USDEC, 2001.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 10. ed., São Paulo: Nobel, 1982. 430p.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102/103, p. 25-34, 2002.

HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 14, n. 5, p. 251-258, 2003.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 4, p. 74-77, 1994.

JAHOOR, F.; JACKSON, A.; GAZZARD, B.; PHILIPS, G.; SHARPSTONE, D.; FRAZER, M. E.; HEIRD, W. Erythrocyte glutathione deficiency in symptom free HIV infection is associated with decrease synthesis rate. **American Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 1, p. E205-E211, 1999.

LEVENHAGEN, D. K.; CARR, C.; CARLSON, M. G.; MARON, D. J.; BOREL, M. J.; FLAKOLL, P. J. Post exercise protein intake enhances whole-body and leg protein accretion in humans. **Medical and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 34, n. 5, p. 828-837, 2002.

LI, J.; WANG, H.; STONER, G. D.; BRAY, T. M. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein malnourished mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 625-633, 2002.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Current Topics in Cellular Regulation**, New York, v. 36, p. 95-116, 2000.

LYONS J.; RAUH-PFEIFFER, A.; YU, Y. M.; LU, X. M.; ZURAKOWSKI, D. TOMPKINS, R. G.; AJAMI, A. M.; YOUNG, V. R. CASTILLO, L. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 97, n. 10, p. 5071-5076, 2000.

MACKAY, D.; MILLER, A. L. Nutritional support for wound healing. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 8, n. 4, p. 359-377, 2003.

MALCOLM, F.; FULLER, M. F.; TOMÉ, D. *In vivo* Determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 88, n. 3, p. 923-934, 2005.

MARKUS, C. R; OLIVIER, B.; DE HAAN, E. H. F. Whey Protein rich in alfa-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, Washington, DC, v. 75, n. 6, p. 1051-1056 2002.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; USHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine α -lactalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosal injury in rats **Bioscience Biotechnology Biochemical**, Tokyo, v. 65, n. 5, p. 1104-1111, 2001.

McINTOSH, G. H.; ROYLE, P. J.; LE LEU, R. K.; ROGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. L.; KENWARD, R. S.; SNITHERS, G. W. Whey protein as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 425-434, 1998.

MUGHAN, P. J. Dietary protein quality in humans – An overview. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 88, n. 3, p. 874-876, 2005.

PARODI, P. W. A role for milk protein in cancer prevention. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 53, n. 1, p. 37-47, 1998.

PINNA, M. H.; LIZIEIRE, R. S. Leite de qualidade. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 21, p. 123-126, 2000.

ROMAN, J. A. **Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da caseína de leite bovino obtida por diferentes processos**. Campinas, SP: UNICAMP, 2002, p. 176. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2002.

RUTHERFURD, R. J.; JOHNSON, D.; CROSS, M. L.; GILL, H. S. Modified milk powder supplemented with immunostimulating whey protein concentrate (IMUCARE) enhances immune function in mice. **Nutrition Research**, New York, v. 25, p. 192-203, 2005.

SAVILLE, B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. **Analyst**, Cambridge, v. 83, p. 670-672, 1958.

SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 7, p. 1865S-1867S, 2000.

SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) – a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 88, n. 3, p. 988-994, 2005.

SGARBIERI, V. C. Fontes protéicas na alimentação. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo, SP. Varela, 1996. 517p.

SGARBIERI, V. C. Food protein and peptides presenting specific promotion to human health (a review). In: **Food for health in the Pacific Rim**. Trumbull: Food and Nutrition Conn, 1999, p. 335-352.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C.; RANGEL, H. A.; ZINSKY, P. F.; PACHECO, T. B.; DIAS, N. F. G. Novel nutritional and physiological functions of milk proteins. In: **Food of 21st Century. Proceedings of the II Food and Resource, Technology and Environment**, October, 17-20, 2000, Wuxi, China, p. 196-210.

SHAN, N. P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84 (suppl. 1), p. S3-10, 2000.

SIQUEIRA, I. M. C.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; GLORIA, M. B. A. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 1-35, 2002.

SPACKMAN, D. C.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of amino acids. **Biochemistry**, New York, v. 17, n. 4, p. 1107-1115, 1958.

SPIES, J. R. Determination of tryptofan in proteins. **Analytical Chemistry**, Arlington, v. 39, n. 12, p. 1412-1415, 1967.

STEELE, R. D.; HARPER, A. E. Protein. In: BROWN, M. L. (Ed.), **Present knowledge in nutrition**. 6. ed. Washington D.C.: Nutrition Foundation, 1990. p. 67-79.

SWAISGOOD, H. E. Characteristics of milk. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 841-878.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v. 57, n. 3-4, p. 145-155, 2003.

VOLPI, E.; FERRANDO, A. A.; YECKEL, C. W.; TIPTON, K. D.; WOLFE, R. R. Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 101, n. 9, p. 2000-2007, 1998.

WALZEM, R. L. **Health enhancing properties of whey proteins and fractions**. Usdec/Applications Monograph, 1999. 108 p.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millenia of evolution create functionalities for mammalian nutrition. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Flórida, v. 42, n. 4, p. 353-375, 2002.

WU, G.; ZHONG-YUN, F.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.

ZIMECKI, M.; WLASZCZYK, A.; WOJCIECHOWSKI, R.; DAWISKIBA, J.; KRUZEL, M. Lactoferrin regulates the immune responses in post-surgical patients. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, v. 49, n. 4, p. 325-33, 2001.